

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Patología Animal I**



**ESTUDIO DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA EN CERDAS  
GESTANTES DE VACUNAS CONTRA EL VIRUS DEL SÍNDROME  
REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO ELABORADAS  
EN ESPAÑA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Mariela M. Scotti Poppino

Bajo la dirección del doctor

José María Castro Arganda

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2152-4**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Patología Animal I.

**Estudio de la Seguridad y Eficacia en Cerdas  
Gestantes de Vacunas Contra el Virus del Síndrome  
Reproductor y Respiratorio Porcino  
Elaboradas en España**

**MARIELA M. SCORTTI**

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 2001.





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Dept. de Patología Animal I

28040 Madrid, España

---

D.José María Castro Arganda, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis titulado **“Estudio De La Seguridad Y Eficacia En Cerdas Gestantes De Vacunas Contra El Virus Del Síndrome Reproductor Y Respiratorio Porcino Elaboradas En España”**, del que es autora la licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup> Mariela SCORTTI ha sido realizado bajo mi dirección en nuestro laboratorio del Departamento de Patología Animal I de esta Universidad y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

En Madrid, a cinco de abril de dos mil uno.

Fdo: José María Castro Arganda

\*A mi familia

ÍNDICE	
Listado de abreviaturas.....	iii
Listado de tablas .....	iv
Listado de figuras .....	vi
Resumen .....	viii
 I. INTRODUCCIÓN .....	 1
1.1. Etiología .....	3
1.2. Variabilidad genética y biológica del VSRRP .....	5
1.3. Patogenia y lesiones .....	8
1.4. Manifestaciones clínicas .....	13
1.5. Transmisión del VSRRP .....	15
1.6. Respuesta inmune frente al VSRRP .....	16
1.7. Diagnóstico .....	19
1.8. Prevención y control .....	22
 II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	 32
 III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	 37
3.1. Cultivos celulares .....	38
3.1.1. Cultivos de MAP .....	38
3.1.2. Línea celular MARC-145 .....	39
3.2. Virus empleados .....	39
3.2.1. Producción de los lotes de virus utilizados.....	39
3.2.2. Titulación de los virus.....	40
3.2.3. Aislamiento de virus a partir de muestras clínicas.....	41
3.2.4. Confirmación del VSRRP mediante la técnica RT-PCR.....	42
3.3. Vacunas empleadas.....	43
3.4. Obtención, preparación y almacenamiento de muestras.....	44
3.4.1. Muestras de sangre.....	44
3.4.2. Hisopos nasales.....	44
3.4.3. Heces .....	44
3.4.4. Muestras recogidas a la necropsia .....	45
3.5. Análisis serológicos .....	46
3.5.1. Seroneutralización vírica .....	46
3.5.2. Técnica de ELISA .....	47
3.6. Análisis hematológicos .....	47
3.7. Diseño experimental para estudiar la seguridad de las cepas vacunales .....	48
3.7.1. Animales empleados y mantenimiento de los mismos .....	48
3.7.2. Tratamientos asignados e inoculación experimental .....	48
3.7.3. Toma de muestras .....	49
3.7.4. Evaluación clínica de las hembras .....	49
3.7.5. Manejo del parto .....	50
3.7.6. Manejo y toma de muestras a partir de los lechones .....	51
3.7.7. Registro de datos productivos .....	52
3.7.8. Análisis estadístico .....	52
 3.8. Diseño experimental para estudiar la eficacia de las vacunas contra el VSRRP.....	 53

3.8.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos.....	53
3.8.2. Sincronización de celos e inseminación artificial .....	54
3.8.3. Asignación de grupos y tratamientos .....	54
3.8.4. Diseño experimental .....	55
3.8.5. Análisis estadísticos .....	58
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
4.1. Estudio de la seguridad en cerdas gestantes de las cepas VP-046 BIS y ALL-183 del VSRRP .....	61
4.1.1. Resultados .....	62
4.1.1.1. Signos clínicos .....	62
4.1.1.2. Parámetros reproductivos y de producción .....	68
4.1.1.3. Detección de anticuerpos .....	76
4.1.1.4. Detección del VSRRP.....	76
i. En cerdas .....	76
ii. En lechones .....	78
4.1.2. Discusión .....	82
4.1.2.1. Inocuidad de las cepas vacunales en las hembras .....	82
4.1.2.2. Persistencia de las cepas vacunales en las hembras .....	84
4.1.2.3. Implicaciones reproductivas-productivas .....	87
4.1.2.4. Infección transplacentaria .....	91
4.2. Estudio de la eficacia en hembras gestantes de las vacunas frente al VSRRP .....	94
4.2.1. Resultados .....	95
4.2.1.1. Signos clínicos .....	95
i. Período correspondiente a la vacunación .....	95
ii. Período correspondiente al desafío .....	102
4.2.1.2. Datos reproductivos y de producción .....	112
4.2.1.3. Serología .....	118
i. Cerdas .....	118
ii. Lechones .....	125
4.2.1.4. Detección del VSRRP .....	126
i. En las cerdas .....	126
ii. En lechones .....	130
4.2.2. Discusión.....	134
4.2.2.1. Signos clínicos asociados a la vacunación .....	135
4.2.2.2. Aislamiento del virus vacuna .....	135
4.2.2.3. Desarrollo de la respuesta inmune .....	136
4.2.2.4. Signos clínicos después del desafío .....	139
4.2.2.5. Aislamiento del VSRRP, cepas virulentas .....	141
4.2.2.6. Aspectos productivos .....	144
4.2.2.7. Infección transplacentaria .....	148
V. CONCLUSIONES .....	153
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	157

## LISTADO DE ABREVIATURAS

AcNt.	anticuerpo neutralizante
ADE	amplificación dependiente de anticuerpos
DI <sub>50</sub> CT	dosis infectiva 50 cultivo de tejido
DMEM	medio esencial mínimo con sales de Eagle modificado por Dulbecco
ECP	efecto citopático
EMEM	medio esencial mínimo con sales de Eagle
GLI	ganglio linfático inguinal
GLRF	ganglio linfático retrofaríngeo
GLSM	ganglio linfático submandibular
IF	inmunofluorescencia
IM	intramuscular
MAP	macrófago alveolar porcino
ORF	marco de lectura abierto
p.i.	post inoculación
p.v.	post vacunación
p/v	peso/volumen
PBS	solución salina tamponada
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RT	transcripción reversa
SRRP	síndrome reproductivo y respiratorio porcino
VA	vacuna atenuada
VI	vacuna inactivada
VSRRP	virus del SRRP

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Cepas del VSRRP empleadas en la inoculación experimental de las cerdas .....	40
Tabla 2. Puntuación de los parámetros clínicos evaluados en las hembras del estudio .....	50
Tabla 3. Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos A, B, C y D, antes y después de la inoculación con el VSRRP .....	63
Tabla 4. Valores individuales de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en los grupos A, B, C y D ..	67
Tabla 5. Datos productivos en las cerdas de los grupos A, B, C y D .....	69
Tabla 6. Resumen de los datos productivos en los grupos A, B, C y D .....	72
Tabla 7. Pesos medios por grupo obtenidos al momento del nacimiento y del destete de los lechones, así como la ganancia de peso a los 21 días .....	75
Tabla 8. Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP y en MARC-145 a partir de las muestras de suero recogidas antes y después de la inoculación con el VSRRP en las cerdas de los grupos B, C y D .....	77
Tabla 9. Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y órganos obtenidos de los lechones pertenecientes a los grupos B, C y D .....	79
Tabla 10. Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos A, B, C, D y E antes y después de la vacunación contra el VSRRP .....	96
Tabla 11. Valores de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en las hembras de los grupos B, C y D, correspondiente al período de vacunación .....	99
Tabla 12. Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos estudiados en el período correspondiente a la inoculación experimental con el VSRRP .....	104
Tabla 13. Signos clínicos observados en las cerdas después de la inoculación con el VSRRP en el día 90 de gestación .....	105
Tabla 14. Valores individuales de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en los animales de los grupos A, B, C, D y E, en el período correspondiente al desafío con cepas virulentas del VSRRP .....	111
Tabla 15. Datos de producción de las cerdas de los grupos A, B, C, D y E .....	113
Tabla 16. Resumen de los datos productivos en los grupos A, B, C, D y E .....	114
Tabla 17. Lechones muertos durante el período de lactación distribuidos por grupo y causa ..	116
Tabla 18. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VSRRP en cerdas pertenecientes a los grupos B, C, D y E, a lo largo del período de estudio .....	121
Tabla 19. Resultados del estudio de determinación de anticuerpos frente al VSRRP por la técnica de ELISA en las cerdas de los grupos B, C, D y E, a lo largo del período de estudio .....	124
Tabla 20. Resultados de la detección de anticuerpos seroneutralizantes contra	

el VSRRP en muestras de suero del día 0 y día 21 obtenidas de los lechones destetados en los grupos B, C, D y E. ....	126
Tabla 21. Resultados del aislamiento del VSRRP en la línea MARC-145, a partir de las muestras de suero obtenidas de las cerdas de los grupos C y D, antes y después de la vacunación y titulación de las positivas. ....	127
Tabla 22. Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP, a partir de las muestras de suero e hisopos nasales obtenidas antes y después de la inoculación con el virus en las cerdas de los grupos B, C, D y E. ....	129
Tabla 23. Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y órganos obtenidas de los lechones de los grupos B, C, D y E. ....	131

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del diseño general utilizado para evaluar la eficacia de las vacunas contra el VSRRP en cerdas gestantes. ....	59
Figura 2. Evolución de la temperatura rectal media en los distintos grupos, en el momento previo a la inoculación con el VSRRP (días -10 a 0) y en dos momentos posteriores (del 1 al 5 y del 6 al 10 p.i.). ....	64
Figura 3. Valores medios de leucocitos por grupo y día de toma de muestra. ....	65
Figura 4. Evolución del porcentaje medio de linfocitos y neutrófilos en los grupos estudiados, antes y después de la inoculación del VSRRP. ....	66
Figura 5. Aspecto exhibido por alguna de las camadas afectadas por el VSRRP. ....	70
Figura 6. Aspecto macroscópico de los fetos momificados tipo II. Destaca la abundante cantidad de líquido en cavidad torácica y abdominal. ....	71
Figura 7. Viabilidad promedio de los lechones en los grupos A, B, C y D, al momento del nacimiento y destete. ....	73
Figura 8. Distintos aspectos de la infección por el VSRRP en lechones al momento del nacimiento y durante el período de lactación. ....	74
Figura 9. Porcentaje de lechones con aislamiento positivo del VSRRP, en cultivos de MAP, correspondiente a los grupos B, C y D. ....	80
Figura 10. Porcentaje de muestras con aislamiento vírico positivo, en los lechones infectados nacidos vivos. ....	81
Figura 11. Evolución de la temperatura rectal media en los animales de los grupos C, D y E en el período previo y posterior a la vacunación. ....	97
Figura 12. Valores medios de glóbulos blancos en las muestras correspondientes a los momentos previo y posteriores a la vacunación de los grupos B, C y D. ....	98
Figura 13. Porcentaje de linfocitos y neutrófilos en el período correspondiente a la vacunación de los grupos B, C y D. ....	101
Figura 14. Lesiones eritematosas en el pabellón auricular de cerdas afectadas por el VSRRP. ....	106
Figura 15. Evolución en el tiempo de la temperatura rectal media de los grupos A, B, C, D y E. ....	107
Figura 16. Valores medios de leucocitos en sangre periférica en los grupos A, B, C y D, en los períodos previo y posterior a la inoculación con cepas virulentas del VSRRP. ...	108
Figura 17. Evolución del porcentaje medio de linfocitos y neutrófilos en los grupos control (A), control infectado (B), vacuna AmervacPRRS (C), vacuna Pysrvac-183 (D) y vacuna Cyblue (E), antes y después de la inoculación con el VSRRP. ....	110
Figura 18. Distribución de los lechones nacidos muertos en los grupos A, B, C, D y E. ....	115



Figura 19. Viabilidad promedio de cada grupo al momento del nacimiento y del destete. ....	117
Figura 20. Peso medio de los lechones por grupo analizado al momento del nacimiento y del destete. ....	118
Figura 21. Respuesta inmune frente al VSRRP, medida por seroneutralización, en los grupos B, C, D y E, a lo largo del período de estudio. ....	120
Figura 22. Títulos de anticuerpos frente al VSRRP, determinados por la técnica de ELISA, en los sueros obtenidos de las cerdas de los grupos B, C, D y E, durante el período de estudio (expresados como log <sub>2</sub> ). ....	10
Figura 23. Porcentaje de lechones con aislamiento vírico positivo en cultivos de MAP, correspondiente a los grupos B, C, D y E. ....	130
Figura 24. Porcentaje de muestras con aislamiento positivo del VSRRP, en los lechones infectados nacidos vivos. ....	133

## RESUMEN

El Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (SRRP) es una patología caracterizada por un incremento en la incidencia de mortalidad fetal y neonatal así como por disfunciones respiratorias en lechones. El agente causal es el VSRRP, un virus RNA altamente variable del que existen dos subgrupos, el americano y el europeo. El subgrupo americano está asociado con una mayor virulencia y la aparición de casos agudos con mortalidad en animales adultos. Descubierta en 1987, la enfermedad presenta actualmente una distribución pandémica y constituye una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción porcina intensiva. La prevención y el control del SRRP son hoy por hoy difíciles y arrojan resultados variables. Están basados fundamentalmente en la vacunación, combinada con prácticas de manejo y pautas sanitarias adecuadas. Existen dos tipos de vacunas disponibles: inactivadas y atenuadas. Las primeras tienen una eficacia limitada mientras que las segundas, desarrolladas a partir de 1994 con virus del subgrupo americano, presentan problemas de seguridad consistentes en la persistencia y transmisión del virus vacunal y el desencadenamiento de brotes de SRRP. La utilización de estas vacunas atenuadas en Europa ha dado lugar a la introducción del subgrupo americano del VSRRP en nuestro continente. En este trabajo de tesis presentamos un detallado estudio de la eficacia y seguridad en cerdas gestantes de una vacuna inactivada (Cyblue®) y dos vacunas atenuadas (AmervacPRRS® y Pyrsvac183®) frente al SRRP desarrolladas en España con virus del subgrupo europeo.

La seguridad de las cepas víricas VP043 y ALL183, contenidas en los productos AmervacPRRS® y Pyrsvac183®, respectivamente, se evaluó mediante inoculación intranasal en cerdas gestantes. A la misma dosis infectiva, la viremia inducida en las madres por las cepas atenuadas fue inferior a la causada por cepas virulentas silvestres utilizadas como control. Las cepas atenuadas, a diferencia de las cepas silvestres, tampoco produjeron signos clínicos ni afectaron significativamente a los parámetros productivos. Sin embargo, las cepas atenuadas indujeron infección transplacentaria, con un 18,6% y un 31,8% de lechones nacidos infectados con VP043 y ALL183, respectivamente, aunque en ningún caso se observaron fetos momificados. Al momento del destete, los lechones positivos al VSRRP fueron del 14,7% y 35,3% para dichas cepas, respectivamente, frente a un 100% observado con las cepas virulentas de campo.

Para estudiar la eficacia de las vacunas, las cerdas fueron inmunizadas 21 días antes de la inseminación artificial e infectadas a los 90 días de gestación con 8 cepas europeas del VSRRP. En estos animales se analizó la respuesta inmune y se estudiaron la

aparición de signos clínicos, la variación de los parámetros productivos y la persistencia vírica. Las tres vacunas generaron anticuerpos frente al producto de la ORF-7 del VSRRP detectados mediante ELISA pero sólo las dos vacunas atenuadas indujeron anticuerpos neutralizantes. Aunque las tres vacunas redujeron la presentación clínica del SRRP en las hembras gestantes, las atenuadas disminuyeron el número de animales virémicos y la duración de la viremia así como, parcialmente, la eliminación nasal de las cepas virulentas. Ninguna de las vacunas previno la infección transplacentaria. Al destete, el porcentaje de lechones positivos al VSRRP fue inferior con las vacunas atenuadas (3,8% con AmervacPRRS® y 30,9% Pyrsvac183® frente a más del 95% con Cyblue®). Los datos productivos en los grupos que recibieron las vacunas atenuadas se acercaron al observado en el grupo control sin infectar, mientras que la vacuna inactivada mejoró levemente los resultados obtenidos en el grupo control infectado.

En conclusión, ninguna de las vacunas analizadas mostró una seguridad y eficacia totales. No obstante, los productos atenuados fueron más efectivos en prevenir las consecuencias reproductivas del SRRP, disminuyendo además el porcentaje de lechones virémicos al momento del destete. El uso racional de estas vacunas derivadas de virus europeo puede constituir una importante herramienta para el control del VSRRP si se acompaña de las adecuadas medidas sanitarias y de manejo a nivel de granja.

# **I. Introducción**

El síndrome reproductor y respiratorio porcino (SRRP) fue descrito por vez primera, en Estados Unidos de América (EE.UU.), al final de la década de los 80. Entonces se lo denominó "Enfermedad misteriosa de los cerdos", dado que era una patología aparentemente nueva, con una etiología desconocida y que producía pérdidas reproductivas y enfermedad respiratoria (Dial *et al.*, 1990). En EE.UU., en el año 1987 aparecieron los primeros casos esporádicos en Carolina del Norte, posteriormente se diseminó por los estados de Minnesota y Iowa y en 1990 estaba en 11 estados de América del Norte y en las provincias de Ontario y Québec pertenecientes a Canadá (Dial y Pearson, 1989; Keffaber, 1989; Dea *et al.*, 1990; Sanford, 1992; Voicu *et al.*, 1992). Estudios serológicos retrospectivos llevados a cabo en EE.UU, utilizando serotecas obtenidas para el control de la enfermedad de Aujeszky, pusieron de manifiesto la presencia de animales positivos a partir de 1985 (Hill *et al.*, 1992). Sin embargo, estudios similares realizados en la provincia de Ontario -Canadá-, revelaron la presencia de sueros positivos a partir de 1979 (Carman *et al.*, 1995).

En Europa, un síndrome similar se detectó en Münster (Alemania) a finales de 1990 (Lindhaus y Lindhaus, 1991), no obstante, los estudios serológicos retrospectivos sugieren la presencia del SRRP desde 1988 (Ohlinger, 1992). Posteriormente, varios países confirmaron su presencia, Holanda y España en enero de 1991, Bélgica en marzo de ese mismo año, en mayo el Reino Unido y en octubre Francia.

En España, los primeros casos se observaron en Cataluña, en un lote de lechones importados de Alemania, que mostraron alteraciones respiratorias (Plana Durán *et al.*, 1992). Al poco tiempo, en dos explotaciones de ciclo cerrado ubicadas cerca de donde habían aparecido los problemas respiratorios, se identificó una enfermedad caracterizada por un aumento en el número de abortos durante la última fase de la gestación y una elevación de la mortalidad durante la lactación. La etiología no fue determinada, pero la sintomatología era similar a la descrita, pocos meses antes, en Alemania. En aquel momento se ordenó el sacrificio obligatorio de todos los animales en las granjas afectadas, sin embargo la enfermedad se extendió por todo el país.

El nombre de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (SRRP) fue designado por la Comisión Europea en 1991, a fin de unificar las diferentes denominaciones que la enfermedad había ido adquiriendo en los distintos países. Asimismo, este organismo hizo obligatoria su notificación y promovió limitaciones al movimiento de animales procedentes de granjas infectadas (European Commission, 1991). Sin embargo, esta medida no impidió la

extensión de la enfermedad por toda Europa, en un breve período de tiempo, por tanto se optó por levantar dichas pautas a finales de 1992. En la actualidad esta enfermedad se encuentra en la lista B de las enfermedades contagiosas de la Oficina Internacional de Epizootias, considerándose una enfermedad global de gran importancia económica.

La enfermedad no quedó limitada a Norteamérica y Europa, detectándose en numerosos países, ya sea mediante estudios serológicos o por presentación clínica. De esta forma, la enfermedad se reconoció en Corea del Sur (1985), en Japón (1988), en Malta (1992), así como en diferentes países de Latinoamérica y Asia (Shin *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1994; Kuwahara *et al.*, 1994; Shimizu y cols, 1994, Hirose *et al.*, 1995; Chueh *et al.*, 1998).

### **1.1. Etiología**

Collins *et al.* (1990) realizaron el primer avance en tratar de identificar el agente causal, dado que lograron reproducir en condiciones experimentales la sintomatología respiratoria de esta enfermedad, mediante la inoculación de cerdos con un homogeneizado filtrado procedente de muestras clínicas.

A principios de 1991, científicos holandeses del "Central Veterinary Research Institute", en Lelystad, descubrieron la etiología del SRRP, el virus Lelystad (Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991). Posteriormente, el virus se aisló en diferentes países europeos (Ohlinger *et al.*, 1991; Plana Durán *et al.*, 1992; Paton *et al.*, 1991; Albina y cols, 1992a y b; Baron *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994) y Canadá (Dea y cols, 1992 a,b,c). En 1992, se aisló el virus en EE.UU., en la línea celular estable CL-2621 y se denominó ATCC VR-2332 (Collins *et al.*, 1992).

En 1993, Meulenbergh *et al.* publicaron la secuencia completa del virus Lelystad. Posteriormente se dieron a conocer otras secuencias genómicas pertenecientes a diferentes cepas del Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (VSRRP).

Sobre la base de los signos clínicos y la forma pandémica del SRRP, podría considerarse que se originó en un sitio geográfico determinado, a partir del cual se diseminó a través del mundo. Sin embargo, el análisis genético muestra al menos dos genotipos diferentes, el Europeo y el Americano, representados por las cepas prototipos Lelystad y VR-2332, respectivamente (Meng *et al.*, 1995b, 2000; Murtaugh *et al.*, 1995; Suarez *et al.*, 1996b; Allende *et al.*, 1999).

Las cepas del VSRRP pertenecientes al genotipo europeo crecen mejor en cultivos de macrófagos alveolares porcinos (MAP), mientras que las cepas correspondientes al genotipo americano puede aislarse inicialmente en líneas celulares establecidas (MA-104 y MARC-145) (Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992a, b; Kim *et al.*, 1993, Meulenberg, 2000). El virus produce un efecto citopático (ECP) caracterizado por redondeamiento y agrupamiento de las células, con posterior muerte y desprendimiento del soporte utilizado para cultivarlas (Pol *et al.*, 1992; Paton *et al.*, 1992). El ECP se desarrolla entre el 1º y 4º día p.i., en cultivos de MAP y entre los días 2-6 p.i. en la línea celular (Benfield *et al.*, 1992a; Pol *et al.*, 1992). Sin embargo, algunos aislados pueden replicar sin producir ECP, o bien requerir de pases sucesivos para ponerlo de manifiesto. Por ello, la presencia del virus se confirma mediante el uso de tinciones inmunológicas o por PCR (Yoon *et al.*, 1992b; Wensvoort *et al.*, 1991).

El VSRRP se clasificó dentro del género *Arterivirus*, familia *Arteriviridae* y orden *Nidovirales*. Entre las principales propiedades del género figuran: i) la capacidad de causar infecciones asintomáticas persistentes o bien enfermedad clínica, ii) replicar en macrófagos y iii) presentar una gran variabilidad genómica (Snijder y Meulenberg, 1998).

El virus posee una forma esférica de 45 a 80 nm de diámetro, una cadena de ARN de 15Kb, poliadenilado y de polaridad positiva. La nucleocápside es de simetría icosaédrica y de 25 a 35 nm de diámetro (Ohlinger *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992a,b; Kim *et al.*, 1993).

El genoma posee 8 marcos de lectura abierta (ORF) que se solapan entre sí y está flanqueado por dos regiones no traducibles 5' y 3'. La ORF 1a y 1b comprenden cerca del 80% del genoma y codifican la ARN-polimerasa dependiente de ARN. Las 5 proteínas estructurales que posee el virus están codificadas por las ORF 2; 4; 5; 6 y 7, que se sitúan en el extremo 3' (Meulenberg *et al.*, 1995, Meulenberg, 2000). La ORF 6 y 7 codifican proteínas no glicosiladas de la membrana (proteína M) y de la nucleocápside (proteína N), respectivamente. Las ORF 2; 3; 4 y 5 codifican proteínas N-glicosiladas denominadas GP2, GP3, GP4 y GP5, respectivamente.

Las tres proteínas mayoritarias del virión son la N, la M y la GP5 (Meulenberg *et al.*, 1995; Bautista *et al.*, 1996a). La proteína N es pequeña (15 kDa) y altamente básica, lo que

puede facilitar su interacción con el genoma en el ensamble de la nucleocápside (Meulenberg *et al.*, 1993). La proteína M, de 18kDa, se sitúa la envoltura y está altamente conservada. La GP5 (25 kDa) es la proteína mayoritaria de la envoltura y presenta gran variación en la secuencia de aminoácidos entre diferentes aislados del VSRRP, sin embargo conserva un perfil hidropático similar (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1995a; Murtaugh *et al.*, 1995; Andreyev *et al.*, 1997).

La GP5 parece jugar un rol preponderante en la infectividad del virus, en la inducción de la respuesta inmune del hospedador y en la producción de apoptosis por parte del VSRRP (Suárez *et al.*, 1996a; Bautista *et al.*, 1999). Estudios realizados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la GP4 y GP5, demuestran *in vitro* la neutralización del virus, sugiriendo que estas proteínas pueden desempeñar un papel importante en la unión a la célula hospedera (Wieczorek-Krohmer *et al.*, 1996; Pizadeh y Dea, 1997).

## **1.2. Variabilidad genética y biológica del VSRRP**

Entre el subtipo americano y europeo existen diferencias no sólo genómicas, sino también de tipo biológica y antigénica. La heterogeneidad biológica queda reflejada tanto *in vivo* como *in vitro*. Por un lado, en los brotes de SRRP en Europa, frecuentemente se observa pigmentación en la piel de los animales afectados, a diferencia de los casos ocurridos en EE.UU. (Goyal, 1993). Por otra parte, las cepas europeas crecen en cultivos primarios de MAP (Wensvoort *et al.*, 1991, 1993), las cepas americanas pueden hacerlo tanto en MAP como en diferentes líneas celulares estables (Benfield *et al.*, 1992a; Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1994, 1996).

Mediante el análisis de las secuencias de nucleótidos de las ORFs, en el caso de la ORFs2-7, existe una distancia genética de un 2,5% al 7,9% entre los aislados americanos y de un 35% entre ambos genotipos (Kapur *et al.*, 1996). Las ORFs 6 y 7 son las más conservadas, relativamente, dentro de cada genotipo, aunque entre ellos se presentan importantes diferencias. La ORF5 presenta gran variabilidad, con una homología del 54% y una identidad de aminoácidos del 55% entre ambos genotipos, que alcanza el 90% cuando se comparan cepas americanas entre sí (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1995a; Murtaugh *et al.*, 1995). De esta forma la GP5 se convierte en la proteína estructural más variable, y la proteína M en la más conservada. La comparación de secuencias entre la



ORF1 de la cepa Lelystad y dos aislados americanos exhibieron importantes diferencias entre los dos genotipos (Allende *et al.*, 1999; Nelsen *et al.*, 1999).

Por otra parte, existen diferentes grados de virulencia entre las cepas, e incluso, cepas no patógenas (Ohlinger *et al.*, 1992; Halbur *et al.*, 1995, 1996a; Joo y Yoon, 1994; Mengeling *et al.* 1996b), quizás asociado a la capacidad de inducir apoptosis (Park *et al.*, 1996). Recientemente, en EE.UU., se describieron brotes agudos atípicos de la enfermedad, poniendo de manifiesto la circulación de cepas más virulentas que las aisladas precedentemente (Bell *et al.*, 1998; Lager *et al.*, 1998; Osorio *et al.*, 1998). Asimismo, Rossow *et al.* (1999) señalaron un marcado tropismo hacia el sistema nervioso en lechones recién nacidos por parte de ciertas cepas del VSRRP.

Análisis filogenéticos llevados a cabo con diversas cepas del genotipo europeo y americano demostraron la existencia de genotipos menores o variantes, siendo los aislados americanos más divergentes entre sí (Meng *et al.*, 1995a; Morozov *et al.*, 1995; Kapur *et al.*, 1996; Suárez *et al.*, 1996a; Gagnon y Dea, 1998; Pirzadeh *et al.*, 1998; Meng, 2000). Sin embargo, estudios recientes llevados a cabo por Andreyev *et al.* (2000) describen un subgenotipo europeo que incluye cepas del VSRRP aisladas en Italia y en Rusia.

Cepas del VSRRP pertenecientes al genotipo americano fueron descritas en Asia, Centroamérica y en Dinamarca (Shibata *et al.*, 1996; Tong *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 2000). En este último caso los aislados están estrechamente relacionados con la cepa que contiene la vacuna atenuada RespRRS<sup>®</sup>, procedente de la cepa VR-2332, utilizada previamente en las granjas (Bøtner *et al.*, 1997; Madsen *et al.*, 1998). Cuando se realizaron aislamientos del VSRRP procedentes de la misma piara, se observaron muy pocos cambios genéticos en la ORF más variable, la ORF5 (Mengeling y Lager, 2000). Estos mismos autores publicaron dos casos, donde los virus obtenidos 9 y 14 meses después de un aislamiento inicial, presentaron 5 nucleótidos diferentes en la ORF5 (1%). Otro estudio llevado a cabo en tres granjas de Illinois, EE.UU., pormenorizaron pocos cambios nucleotídicos entre los virus aislados a diferentes tiempos (Goldberg *et al.*, 2000).

Los mecanismos causantes de toda esta variabilidad son pocos conocidos. No obstante, por tratarse de un virus ARN la variabilidad queda determinada, al menos en parte, por la baja fidelidad que posee la enzima ARN-polimerasa-ARN-dependiente (Domingo y Holland, 1992).

Otro mecanismo importante de evolución en los virus ARN es la recombinación. De los análisis llevados a cabo por Kapur *et al.* (1996), quedó de manifiesto la recombinación intragénica en el segmento de la ORF2-ORF5 y en la ORF7 entre diez aislados diferentes del genotipo americano del VSRRP.

Más recientemente, Yuan *et al.* (1999) descubrieron evidencias de recombinación homóloga entre aislados del VSRRP propagados en cultivos celulares. Las partículas de virus recombinantes contenían proteínas quiméricas de la ORF3 - ORF4, y fueron obtenidas de un cultivo de células MA-104 co-infectado con dos cepas del VPRRS diferentes. Los análisis de secuencias de aislados de campo del VSRRP sugieren que la recombinación del ARN podría estar ocurriendo en la naturaleza (Yuan *et al.*, 1999). La recombinación parece ser un evento frecuente en los *nidovirales* llevándose a cabo en regiones con gran identidad de nucleótidos entre sí (Li *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1999).

Recientemente, Oleksiewicz *et al.* (2000) identificaron un mutante de delección natural en una cepa europea del VSRRP que carece de la secuencia antigénica RKASLSTS, perteneciente a la región carboxilo del la GP3, poniendo de manifiesto la importancia de la respuesta inmune humoral frente a las proteínas estructurales minoritarias del genotipo europeo para la evolución vírica.

Cualquiera de los mecanismos anteriormente descritos producen, durante el transcurso de una infección, diferentes subpoblaciones estrechamente relacionadas y conocidas con el nombre de *quasiespecies* (Bukh *et al.*, 1995). Las quasiespecies están sujetas a una continua variación genómica, así como a procesos de selección y competición que llevan al predominio de una o varias secuencias mejor adaptadas (Domingo *et al.*, 1998).

Este fenómeno recobra importancia, puesto que podría llevar al VSRRP a producir una infección persistente, en el supuesto caso que se seleccionaran aquellos mutantes capaces de eludir los anticuerpos neutralizantes o los linfocitos T citotóxicos (Duarte *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 1996; Domingo *et al.*, 1998). En este sentido, Rowland *et al.* (1999) describieron la primer evidencia de la evolución de quasiespecies del VSRRP y la emergencia de una subpoblación de la cepa prototipo americana, durante una infección intrauterina en cerdas.

Por otra parte, la existencia de diferentes subpoblaciones durante la infección vírica podría tener implicaciones sobre la eficacia de la vacunación y conducir a un fallo vacunal (Domingo y Holland, 1992; Duarte *et al.*, 1994; Domingo *et al.*, 1998).

### **1.3. Patogenia y lesiones**

En relación a la patogenia, es necesario primeramente entender como el virus infecta las células del hospedador, para luego poder comprender los mecanismos causantes de enfermedad.

En el caso del VSRRP, en diferentes ocasiones se han realizado infecciones experimentales de cerdos siguiendo las vías intraamniótica (Lager y Mengeling, 1995), intrauterina (Yaeger *et al.*, 1993; Lager *et al.*, 1996b; Prieto *et al.*, 1997b), oronasal (Tepstra *et al.*, 1991), intraperitoneal (Swenson *et al.*, 1994a) e intravenosa (Mengeling *et al.*, 1994). En todas ellas, a excepción de la vía intraamniótica, se asume que el virus o bien contacta con células susceptibles en el sitio de exposición o se adhiere o es englobado por células locales y entonces interactúa con células permisivas de otro sitio. La infección de los fetos probablemente ocurra por la ingestión de líquido amniótico cargado de partículas víricas.

Estudios realizados con anticuerpos monoclonales identificaron a los macrófagos como células diana de la infección (Duan *et al.*, 1997b; Lawson *et al.*, 1997) y los macrófagos alveolares como el sitio predominante de replicación vírica. Asimismo, en el tejido linfoide se pudo identificar una significativa población de macrófagos positivos al VSRRP y quizás también de linfocitos. No obstante, estudios *in vitro* realizados por Molitor *et al.* en 1997, no pudieron demostrar la replicación del virus en linfocitos, pero sí en monocitos (Voicu y cols, 1994). Esos mismos autores, así como Duan *et al.* (1997b) observaron que durante una infección no todos los macrófagos se llegan a infectar, existiendo subpoblaciones resistentes que podrían diferenciarse en células susceptibles. Asimismo, se observó antígeno y ácido nucleico vírico en células endoteliales (Rossow *et al.*, 1995) y en células espermatogénicas (Sur *et al.*, 1997).

Existe evidencia de que el VSRRP penetra a la célula vía de la endocitosis dependiente de pH (Kreutz *et al.*, 1996) y se une a un receptor putativo de 210 kDa que ha sido identificado en macrófagos (Duan *et al.*, 1998). El VSRRP puede entrar también en células fagocíticas a través de un mecanismo dependiente de anticuerpos, conocido como

amplificación de la replicación vírica mediada por anticuerpos o ADE. Mediante este sistema, complejos de virus-anticuerpo penetran a la célula a través de un receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina.

Este fenómeno ha sido descrito en otras infecciones víricas donde los signos clínicos se exacerban cuando un animal seropositivo es expuesto al virus nuevamente (Gimenez *et al.*, 1989; Kurane *et al.*, 1991; Olsen *et al.* 1992). En el caso del VPRRS, este hecho se ha demostrado tanto *in vitro* (Choi *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1996), en presencia de dosis subneutralizantes de anticuerpos IgG específicos, como *in vivo* en fetos infectados (Christianson *et al.*, 1993) y en lechones (Yoon *et al.*, 1994, 1996). A pesar de que se desconoce el significado clínico de este evento, estudios experimentales avalan la posibilidad de que el sistema ADE desempeñe un papel importante en la patogénesis del SRRP (Yoon *et al.*, 1996). De esta forma se especula, que podría estar implicado en el aumento de la susceptibilidad al virus, como cuando descienden los niveles de anticuerpos maternos en los lechones, momento en el que son altamente susceptibles a la enfermedad respiratoria causada por el VSRRP (Polson *et al.*, 1992; Zeman *et al.*, 1993).

Por su parte, el VSRRP posee una elevada capacidad de infección, dado que pequeñas cantidades de virus, del orden de 20 a 40 partículas infectivas, son capaces de infectar a lechones por la vía oronasal o intramuscular (Zimmerman *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1999b). Esto podría sugerir que se encuentra un número considerable de células permisivas en el sitio de exposición para permitir que al menos un virus infectivo tome contacto con ellas; o bien, la existencia de un mecanismo eficiente de transporte del virus hasta las células blanco. No obstante más estudios son requeridos para poder dilucidar esta cuestión.

Una vez dentro de la célula, el ciclo de replicación es rápido, produciéndose partículas infectivas dentro de las 10 horas y 12 horas después de la inoculación *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Rossow *et al.*, 1995; Pol *et al.*, 1997). La infección produce una lisis de la célula hospedera e induce apoptosis en la células adyacentes (Suárez *et al.*, 1996a; Sur *et al.*, 1997, 1998; Sirinarumitr *et al.*, 1998). Esto podría explicar algunas de las lesiones asociadas al VSRRP, por ejemplo la neumonía intersticial. Sin embargo, existe otra teoría que sustenta que las lesiones son provocadas de una forma indirecta, mediante la liberación de citoquinas por parte de macrófagos disfuncionales infectados. Esta teoría se basa en que a diferencia de otros virus respiratorios, solamente pequeñas cantidades de antígeno del VSRRP pueden ser demostradas en el tejido pulmonar. Si bien esta teoría no ha sido

demostrada, aparentemente cobra valor para explicar el fallo reproductivo, dado que en el tracto reproductivo es insignificante la cantidad de virus infectivo, antígeno o ácido nucleico que se puede detectar. En el caso de los verracos, el VSRRP, es igualmente difícil de detectar, aunque se le pudo identificar en células claves, como las del tejido espermatogénico (Sur *et al.*, 1997). En este punto, es importante tener en cuenta que la escasez de virus en los tejidos puede deberse a la sensibilidad de los métodos utilizados para detectarlo.

Cerdos de todas las edades son susceptibles a la infección con el VSRRP, siendo el período de incubación variable, si bien en animales infectados experimentalmente los primeros signos aparecen entre los días 2 y 7 p.i., normalmente (Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1994, 1995; Halbur *et al.*, 1995). La vía de entrada natural del virus es la oronasal, replicándose primariamente en los MAP, a partir de donde se desencadena una rápida diseminación del virus al resto del organismo vía hemática y posiblemente linfática. Sin embargo, Pol *et al.* (1991) opinan que la primoreplicación se podría producir en el epitelio nasal y bronquial, explicando de este modo las lesiones degenerativas observadas en ambas mucosas.

El período virémico es bastante prolongado, aunque muy variable, y es posible detectar el virus desde las 12 horas p.i. (Rossow *et al.*, 1995) hasta incluso en el día 63 p.i. (Vézina *et al.*, 1996), se considera de 28 días el período medio. Diversos factores podrían influir en la duración de la viremia, entre ellos la edad de los animales, las dosis infectiva y la cepa del virus actuante (Yoon *et al.*, 1993).

La diseminación hemática permite al virus llegar a diferentes órganos en poco tiempo. Como consecuencia se le puede detectar en amígdalas, pulmón, bazo y linfonódulos, principalmente (Rossow *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1997a). El virus se localiza, fundamentalmente, en los macrófagos presentes en dichos órganos (Halbur *et al.*, 1996a). En los MAP obtenidos en lavados pulmonares, se pudo detectar el virus hasta 70 días p.i. (Mengeling *et al.*, 1996c). Además de las localizaciones mencionadas, es posible encontrar el virus de forma esporádica en hígado, riñón, glándulas adrenales y cerebro, entre otros. La presencia del virus en dichas localizaciones y los fenómenos inflamatorios concomitantes explican la mayoría de las lesiones observadas en los animales infectados. Entre ellas podemos citar, hiperplasia folicular de los ganglios linfáticos, rinitis, miocarditis y encefalitis (Halbur *et al.*, 1995; Rossow *et al.*, 1995).

El VSRRP, como el resto de los *arterivirus*, poseen la capacidad de producir infecciones persistentes (Wills *et al.*, 1995; Benfield *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia del virus de la lactato deshidrogenasa del ratón (VLD), la persistencia se realiza en ausencia de viremia (Plagemann y Moenning, 1992). Existen posturas contrapuestas en relación al sitio de persistencia del virus. Mientras algunos autores opinan que se realiza en el pulmón (Collins *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1997a; Shibata *et al.*, 1997), otros aseguran que el virus permanece en tejidos linfoides (Rossow *et al.*, 1995) o en el testículo (Benfield *et al.*, 1998).

El mecanismo por el cual ocurre la coexistencia de infecciones persistentes y la inducción de apoptosis, no está del todo dilucidado. Una posible fundamentación está en el fenómeno de las quasiespecies, donde ciertas subpoblaciones del virus podrían tener alterada la capacidad de promover apoptosis (Suárez, 2000). Otras posibles explicaciones se basan en fenómenos que ocurren en el caso de otros virus ARN, como podría ser la existencia de genes inhibidores de la apoptosis (Tolskaya *et al.*, 1995), o bien la expresión de proteínas celulares que alteraran la interacción virus-célula, como se describió para el virus Sindbis (Levine *et al.*, 1993).

La patogenia de la enfermedad respiratoria posee dos orígenes, fundamentalmente. Por un lado se produce una rinitis con destrucción del sistema mucociliar, que compromete la protección ejercida por esta barrera de defensa, facilitando la colonización por agentes secundarios. Paralelamente, ocurre una destrucción masiva de los MAP, que puede llegar al 65% en la primer semana de la infección (Molitor *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Molitor, 1993). Sumado a ello, existe una disfunción de los macrófagos, consistente en una alteración en la capacidad de liberación del anión superóxido y la supresión del NADPH en los macrófagos infectados, comprometiendo de esta forma un importante componente de la respuesta inmune pulmonar (Molitor, 1993).

Por otra parte, es probable que los macrófagos infectados y en estado de degeneración liberen interleuquinas, favoreciendo el proceso inflamatorio. De esta forma, la presencia del VSRRP en pulmón se asocia con una neumonía intersticial multifocal. Las lesiones microscópicas se focalizan en los alveolos, con adelgazamiento de los septos, e infiltraciones de macrófagos, linfocitos y proliferación de neumocitos tipo II (Pol *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992; Paton *et al.*, 1992; Halbur *et al.*, 1994; Rossow *et al.*, 1995). La luz alveolar se encuentra llena de células inflamatorias y restos de células necróticas. Las

lesiones aparecen en el día 3 p.i., pudiendo persistir, al menos, hasta el día 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995).

Recientemente, se ha especulado con la posibilidad de que algunas de las lesiones extrapulmonares atribuidas al VSRRP sean causadas por el circovirus porcino tipo II (CVP2), como es el caso de la vasculitis multisistémica y la miocarditis. Asimismo, existe evidencia significativa de que la coinfección del VSRRP y el CVP2 podrían ser los principales patógenos asociados a la neumonía necrotizante proliferativa (Pesch *et al.*, 2000).

En el verraco el virus se replica en el testículo, ya sea en los macrófagos del intersticio como en las células germinales de los tubos seminíferos, espermatidas y espermátocitos (Sur *et al.*, 1997; 2000). Este hecho podría explicar la liberación del virus por semen en ausencia de viremia. En el semen, el virus se encuentra tanto asociado a células (Molitor y Shin, 1995) como en la fracción no espermática (Christopher-Henning *et al.*, 1995a,b).

En infecciones experimentales, el virus afecta la calidad espermática (Prieto *et al.*, 1996a; 1997b) y esto puede estar asociado a una disminución en las tasas de concepción. En hembras, la patogenia está estrechamente vinculada al estado fisiológico. Aparentemente, el VSRRP no posee un efecto claro sobre las tasas de concepción y fertilización (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994b, 1995; Lager *et al.*, 1996b; Prieto *et al.*, 1996b). Prieto *et al.* (1996c) publicaron la falta de susceptibilidad del huevo y blastocisto a la infección por el VSRRP. Posiblemente debido a la incapacidad del virus para atravesar la zona pelúcida o la falta de diferenciación celular que impide o dificulta la replicación del virus.

Durante la gestación, se ha demostrado que en los dos primeros tercios la importancia del VSRRP, es relativamente baja, en comparación con el último tercio. Por un lado, los fetos de cualquier edad son susceptibles al VSRRP, no obstante la producción de lesiones y muerte ocurre sólo durante el último período (Lager y Mengeling, 1995). En cerdas grávidas, el virus puede atravesar la barrera placentaria, de forma libre o asociado a células hemáticas e infectar a los fetos, los cuales pueden nacer virémicos y persistentemente infectados (Mengeling y cols, 1994). Este fenómeno sucede cuando la infección es en la segunda mitad de la gestación. Según avanza la gestación la vascularización de la placenta es más íntima, tomando una posición subepitelial y

produciéndose una invasión de los trofoblastos por los capilares fetales. Como consecuencia de ello, existe un mayor intercambio entre los capilares materno-fetales, lo que podría aumentar las posibilidades de que el virus infecte a los fetos (Christianson *et al.*, 1993). Además se observaron cambios degenerativos en placenta, produciendo separaciones multifocales en las capas epiteliales que lleva a una separación prematura de la unión materno-fetal (Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993). El cordón umbilical también puede verse afectado, la lesión corresponde a una vasculitis necrotizante con hemorragias periarteriales. Estas dos últimas lesiones podrían llevar a la muerte fetal por hipoxia, explicando de este modo la ausencia de lesiones en fetos muertos procedentes de cerdas infectadas al final de la gestación (Christianson *et al.*, 1992; Plana Durán *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994).

#### **1.4. Manifestaciones clínicas.**

Dentro de una granja, los signos clínicos causados por el VSRRRP son similares en EE.UU. y en Europa (Keffaber, 1989; Loula, 1991; de Jong *et al.*, 1991; Leyk, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991; Sanford, 1992; Gordon, 1992; White 1992a,b). Como característica principal figura la amplitud de manifestaciones que pueden hallarse, variando de una forma clínica a una subclínica con infecciones persistentes (Robertson and Thrusfield, 1992; Morrison *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1995; Benfield *et al.*, 1996). Dentro de los principales factores implicados en la presentación del SRRP, encontramos la virulencia de la cepa del virus implicada (Halbur *et al.*, 1996b), el estado inmunitario de la granja (Keffaber 1989; Wensvoort, 1993), así como los factores de manejo (Blaha, 1992; White 1992a).

La presentación epidémica suele darse en granjas seronegativas, y se caracteriza por una elevada proporción de animales virémicos, con anorexia o letargia que rápidamente diseminan la infección a toda la granja. En cerdas en producción pueden diferenciarse dos etapas: i) coincidiendo con la fase aguda de la enfermedad, suele ocurrir una baja proporción de abortos (1-3%), entre los 21 y 109 días de gestación (Hopper *et al.*, 1992; White 1992a), que puede estar acompañados con mortalidad en las hembras (<4%) (Loula, 1991); ii) aproximadamente una semana después, y como consecuencia de la infección transplacentaria del virus, se produce un fallo reproductivo en animales con gestación a término (100 a 118 días de gestación), caracterizada por partos prematuros (Gordon, 1992). Asimismo en estas camadas está incrementado el número de lechones nacidos muertos, de



fetos momificados, así como de lechones nacidos débiles (Keffaber, 1989; Loula, 1991; White, 1992a). Esta etapa es mucho más prolongada que la inicial, pudiendo durar hasta 4 meses.

La anorexia y la letargia son los signos más comúnmente descritos en animales enfermos con el SRRP en la forma aguda, que pueden ir acompañados de fiebre, leucopenia, linfopenia y disnea. Además de ellos, en cada grupo productivo se aprecian características propias.

En verracos la infección con el VSRRP normalmente pasas desapercibida, aunque en determinados casos experimentales se ha observado una disminución e incluso pérdida de la libido (Yaeger *et al.*, 1993; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a; Prieto *et al.*, 1996a). El efecto del VSRRP en la función y morfología del espermatozoide es contradictoria en las diferentes publicaciones (Prieto *et al.*, 1996a; Christopher-Hennings *et al.*, 1997).

La infección con el VSRRP en cerdas durante el último tercio de la gestación desencadena la presentación clínica de la enfermedad, con abortos, partos prematuros, aumento del número de lechones nacidos muertos y nacidos débiles (Christianson *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1994).

Los lechones destetados infectados con el VSRRP presentan diversos signos clínicos, entre ellos fiebre, disnea, neumonía, letargia, debilidad, dependiendo la gravedad de las posibles y frecuentes infecciones secundarias (Rossow, 1996). En tanto que en lechones de cebo, el SRRP suele manifestarse con fiebre transitoria inapetencia y menores rendimientos productivos (Goyal, 1993; Rossow, 1996).

En lechones lactantes suele existir una elevada morbilidad y mortalidad. A ello contribuyen varios factores, por una parte, el alto porcentaje de lechones nacidos débiles que mueren por inanición y/o por aplastamiento, sobretodo durante la primer semana de vida (Dial *et al.*, 1990; Blackburn, 1991; Raymarkers, 1991; Dee, 1992; Hopper *et al.*, 1992). Sumado a ello, la aparición de la sintomatología respiratoria que a menudo se complica con infecciones secundarias (Loula, 1991; de Jong *et al.*, 1991; Blackburn, 1991; Blaha, 1992) y diarreas que no responden al tratamiento, aunque esta última no es constante (Keffaber, 1989; Blackburn, 1991; Ahl *et al.*, 1992). Asimismo, se han descrito alteraciones circulatorias en lechones recién nacidos, que pueden producir hemorragias en el cordón

umbilical o durante las operaciones de corte de rabo, castración o inyección de hierro (Hopper *et al.*, 1992).

En cerdos destetados, la presentación aguda del SRRP suele manifestarse con anorexia, letargia y disnea, aunque quizás lo más importante es la baja tasa de ganancia de peso y de eficiencia de conversión alimenticia observada en los animales infectados (Moore, 1990; White 1992b). Sumado a ello, varios autores han encontrado un aumento en la incidencia de enfermedades endémicas (por ejemplo de la enfermedad de Glässer, disentería porcina, streptococias, neumonía necrotizante, etc) produciendo una elevación en la tasa de mortalidad (Moore, 1990; Loula, 1991; Blaha, 1992; Keffaber *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1993).

Una vez que se sobrepasa la forma aguda, las granjas suelen quedarse en un estado de PRRS endémico, que puede durar varios años (Stevenson *et al.*, 1992, 1993; Terpstra *et al.*, 1992). Para que ello ocurra, varios posibles mecanismos se encuentran implicados, entre los que cabe destacar: la presencia de animales persistentemente infectados capaces de eliminar el virus (Albina *et al.*, 1994a,b; Wills *et al.*, 1995; Benfield, 1997); la replicación del virus en lechones destetados (Stevenson *et al.*, 1994), así como la introducción de animales susceptibles (Dee and Joo, 1994b).

Dentro de una granja con infección crónica, los casos clínicos se limitan, generalmente, a los animales de remplazo (Grosse-Beilage and Grosse-Beilage, 1992; Dee and Joo, 1994b; Dee *et al.*, 1996).

### **1.5. Transmisión del VSRRP**

La transmisión del VSRRP es directa, a través del contacto entre animales y por medio del semen contaminado. No obstante, esto no es suficiente para explicar la frecuencia de muchos brotes agudos de la enfermedad en criaderos libres de PRRS, a pesar de los controles de bioseguridad implantados. En este sentido, varios autores publicaron la aparición de transmisión directa por contacto a partir de animales que sufrieron la infección con varias semanas de antelación (Zimmerman *et al.*, 1992; Albina *et al.*, 1994a,b; Benfield *et al.*, 1997; Wills *et al.*, 1997). Actualmente, no se conoce muy bien porque algunos animales llegan a convertirse en portadores crónicos, que pueden demorar

meses en clarificar el virus, en contraposición a otros cerdos que están libres de virus en pocas semanas.

No obstante, hasta el presente no se han publicado infecciones de SRRP que duren toda la vida del animal. Los cerdos portadores pueden eliminar el virus durante largos períodos de tiempo, ya sea de forma continua o intermitente. La incidencia de animales portadores en una piara es difícil de estimar, puede ser baja y permitir que se llegue a una situación de granja negativa o bien producir un estado endémico de SPPR. La principal fuente de animales portadores se encuentra en los lechones nacidos de cerdas infectadas al final de la gestación (Albina *et al.*, 1994a; Mengeling *et al.*, 1994; Benfield *et al.*, 1997).

Una vez que ocurre la infección en una piara, el VSRRP tiende a circular dentro de la granja indefinidamente, siendo muy poco probable la eliminación espontánea. La forma de perpetuarse es a través de la transmisión congénita o bien mediante la infección de animales seronegativos que se incorporan a la producción.

La transmisión indirecta puede ocurrir en el campo, sin embargo es muy difícil de demostrar experimentalmente. Existen algunas investigaciones que avalan la transmisión por aerosoles como la principal vía de transmisión. Sin embargo, a nivel experimental se observó que tiene poca incidencia, quizás por la escasa producción de tos que desencadena la enfermedad. La asociación con otras entidades nosológicas del aparato respiratorio pueden producir un sinergismo que resulte en una transmisión más eficiente.

Ciertas aves pueden actuar como vectores biológicos o mecánicos (Zimmerman *et al.*, 1997), aunque se desconoce su importancia.

### **1.6. Respuesta inmune frente al VSRRP**

Los cerdos infectados con el VSRRP producen una respuesta inmune tanto celular como humoral, siendo ésta última fácilmente detectada por la presencia de anticuerpos específicos.

Por otra parte, los animales que padecieron una primoinfección y son nuevamente expuestos al virus, pueden o no sufrir la enfermedad. Este hecho es difícil de reproducir en condiciones experimentales, no obstante diferentes autores señalan el desarrollo de una

respuesta inmune protectora contra cepas homólogas (Christoper-Henning *et al.*, 1997; Hesse *et al.*, 1996a; Lager *et al.*, 1997a, 1999), que incluso puede ser de larga duración (Lager *et al.*, 1997).

Sin embargo, cuando se utilizan para el desafío cepas heterólogas, no siempre se alcanzó una protección satisfactoria. De esta forma, algunos animales aparecieron normales después del desafío, con niveles no detectables de virus circulante, mientras en otros animales se observó una viremia, pudiendo incluso estar acompañada de signos clínicos (Hessel *et al.*, 1996a; Gorcyca *et al.*, 1997b; Shin *et al.*, 1997; Bøtner *et al.*, 1999; Lager *et al.*, 1999; Mengeling *et al.*, 1999a).

Si bien la cinética de la inmunidad contra el VSRRP no está dilucidada totalmente, la protección parece estar dada, tanto por la inmunidad de base celular como la humoral. La respuesta humoral a la infección por el VSRRP se detecta a partir del día 6 o 7 p.i. por la aparición de IgM, mientras que las IgG aparecen a partir de la 2ª semana p.i. (Loemba *et al.*, 1996; Vezina *et al.*, 1996). No obstante, los anticuerpos neutralizantes no se detectan hasta 4-6 semanas después de la infección (Benfield *et al.*, 1992b; Christianson *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1994; Yoon *et al.*, 1994; 1995) y la aparición de estos anticuerpos usualmente coincide con la desaparición de la viremia. Yoon *et al.* (1994) introdujeron modificaciones en la técnica de seroneutralización que permite detectar estos anticuerpos a partir del día 11 p.i. El título de anticuerpos neutralizantes va en aumento hasta el día 127 p.i. para disminuir hacia el día 262 p.i. (Nelson *et al.*, 1994). Una respuesta inmune celular específica contra el VSRRP se empieza a detectar en el mismo período (Bautista y Molitor, 1997; Albina *et al.*, 1998; Lopez-Fuertes *et al.*, 1999).

Diversos estudios se han llevado a cabo para identificar las proteínas del virión que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes. Varios autores coinciden en que la GP5 está asociada con epítomos neutralizantes (Yoon *et al.*, 1995; Pizadeh y Dea 1997, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Weiland *et al.*, 1999). Recientemente, Gonin *et al.* (1999) demostraron una correlación positiva entre seroneutralización y la respuesta de anticuerpos frente a la GP5, mientras que no hallaron relación contra los que reconocían a las proteínas GP3, GP4 y N. No obstante, el papel de la GP4 permanece en debate. Mientras que en el virus Lelystad aparentemente induce anticuerpos neutralizantes, aunque de menor eficacia que los promovidos por la GP5 (Meulenberg *et al.*, 1997; Weiland *et al.*, 1999), en el genotipo americano no tendría relación con este tipo de anticuerpos (Zhang *et al.*, 1998; Gonin *et al.*, 1999). No obstante, el papel de la inmunidad humoral en la protección contra el

VSRRP no está claro. Por una parte, la viremia se mantiene aunque halla anticuerpos circulantes, y por otro sólo se ha podido demostrar la capacidad neutralizante del anticuerpo en cultivos de células MARC-145, pero no en cultivos de MAP. Sumado a ello, y como ya se mencionó, los anticuerpos favorecerían la penetración del virus a los macrófagos, mediante el sistema ADE (Choi *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1995).

A igual que en otros virus, la inmunidad de base celular posee un rol importante en la protección contra la enfermedad (Choi *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Vézima *et al.*, 1996; Bautista y Molitor, 1997; Pirzadeh y Dea, 1998; Bautista *et al.*, 1999). Diversos estudios demostraron una respuesta celular específica contra el VSRRP *in vivo* e *in vitro* (Vézima *et al.*, 1995; Bautista y Molitor, 1997; Pirzadeh y Dea, 1998), así como una respuesta citotóxica T dependiente y actividad de células NK (Vézima *et al.*, 1996; Bautista y Molitor, 1997; Bautista *et al.*, 1999; Samsom *et al.*, 2000). Mediante ensayos de linfoproliferación *in vitro* se observó proliferación a partir de las 4 semanas, para disminuir a partir de la semana 11 p.i. No obstante, según estudios de López-Fuertes *et al.* (1999), puede permanecer detectable por más de 3 meses. Existe controversia en cuanto a las células implicadas, ciertos estudios apuntan principalmente a células CD4+, que incluye las células T-helper (Zhou *et al.*, 1992; Bautista y Molitor, 1997; López-Fuertes *et al.*, 1999). Mientras que en otros trabajos la respuesta fue fundamentalmente dependiente de CD8+, que son marcadores de células T citotóxicas (Shimizu *et al.*, 1996).

Sobre la base de estudios experimentales, infecciones sucesivas con virus homólogos no inducen una respuesta inmune humoral anamnésica consistentemente (Bautista y Molitor, 1997; Lager *et al.*, 1997a, b). Esto guarda relación con las observaciones a campo, donde cerdas vacunadas varias veces llegan a ser seronegativas. Sin embargo, se ha descrito una importante respuesta inmune secundaria de base celular, sugiriendo un rol fundamental en la inmunidad protectora (Bautista y Molitor, 1997).

En infecciones experimentales y naturales, la ingestión de calostro desde cerdas suficientemente inmunizadas confirió cierta protección contra la enfermedad (Chung *et al.*, 1997) y quizás contra la infección. En los lechones que nacen virémicos los anticuerpos calostrales no parecerían que confieren protección. Estos animales pueden permanecer virémicos hasta 2 meses, aunque ingieran calostro e infectar a otros de la misma camada (Mengeling *et al.*, 1994; Bøtner *et al.*, 1994).

Diversas observaciones de campo han relacionado epidemias de PRRS con un aumento de la incidencia y severidad de infecciones secundarias, indicando un posible efecto inmunosupresor (Groschup *et al.*, 1993; Kay *et al.*, 1994; Pijoan *et al.*, 1994; Zeman, 1996). No obstante, la evidencia obtenida es ambigua, principalmente por la dificultad que representa reproducir experimentalmente este tipo de infecciones mixtas. Mientras ciertos autores encuentran un efecto sinérgico del PRRS con otros microorganismos (Galina *et al.*, 1994; Thacker *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1999), en otros trabajos no fue posible poner de manifiesto dicha interacción (Cooper *et al.*, 1995; Alstine *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997; Pol *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1997; Depner *et al.*, 1999). Es probable que cualquier efecto sea propio de un deterioro pasajero de las defensas a nivel del pulmón, lo que es difícil de reproducir experimentalmente. No obstante, existen datos preliminares que sugieren que la respuesta inmune específica contra el VSRRP puede tener un efecto modulador negativo debido a la inducción de citoquinas específicas (Asai *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2000).

### **1.7. Diagnóstico**

El SRRP, por diversos motivos, no es una enfermedad fácil de identificar. Las manifestaciones clínicas son muy variables en función de la edad y susceptibilidad de los cerdos afectados, la virulencia de la cepa vírica, la implicación de agentes secundarios y la edad de gestación en las cerdas, entre otros. Por ello, es muy difícil realizar un diagnóstico adecuado basándose en la sintomatología. Asimismo, el diagnóstico anátomo-patológico no aporta un resultado decisivo. Como ya se mencionara previamente, no se observan lesiones macroscópicas claramente adjudicables al VSRRP. En el análisis histológico lo más característico es la neumonía intersticial. No obstante, esta lesión también puede atribuirse a otros agentes infecciosos, como el virus de la influenza porcina y el coronavirus respiratorio.

Por lo tanto, para realizar un diagnóstico definitivo es necesario obtener datos sobre la historia clínica, ocurrencia de signos y lesiones, antecedentes productivos de la granja, realizar análisis serológicos y detectar la presencia del VSRRP.

Para la detección de anticuerpos se emplean las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) y el inmunoensayo (ELISA). El ELISA reacciona de una forma más general que el IFI y el IPMA y por tanto tiene mayor sensibilidad para detectar anticuerpos contra cualquier cepa particular del virus. Por otra parte, para la detección cuantitativa de anticuerpos, el ELISA es menos empleado, ya que

los títulos dados no se correlacionan linealmente con las concentraciones relativas de anticuerpos (Mengeling y Lager, 2000). No obstante, ninguno de estos ensayos puede interpretarse como una medida directa del nivel de inmunidad protectora.

Los anticuerpos neutralizantes pueden correlacionarse con protección específica, al menos en ciertos casos. Esta técnica no puede realizarse en cultivos de MAP, debido a un efecto de amplificación de la infección (Choi *et al.*, 1992). Es un ensayo poco utilizado, debido a su elevado costo, la dificultad técnica que presenta y el tiempo que implica llevarlo a cabo.

Teniendo en cuenta la amplia difusión que presenta la enfermedad, se hacen necesarias las muestras pareadas para determinar si una infección ha sido reciente o no. Teniendo en cuenta que la mayoría de los lechones seroconvierten en las lechonerías, los cerdos de 3-4 meses de edad son un buen indicador de la presencia de enfermedad (Thacker, 1992). En estudios realizados por Freese *et al.* (1994) se pudo observar que en granjas con el SRRP endémico, la mayoría de los lechones son negativos al momento del destete, pero más del 80% de ellos seroconvierten a las 8 ó 10 semanas de vida. Además como en lechones que nacen infectados suelen presentarse anticuerpos circulantes, la sangre recogida previa a la ingesta de calostro o el líquido ascítico son una buena muestra para la búsqueda de anticuerpos (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992).

La inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia son útiles para detectar antígeno vírico en tejidos de cerdos infectados (Benfield *et al.*, 1992a, Nelson *et al.*, 1992; Magar *et al.*, 1993). Estas técnicas se emplean más frecuentemente en estudios experimentales de patogénesis, dado que requieren mucha destreza y experiencia técnica para su correcta interpretación (Mengeling y Lager, 2000).

Para detectar el ARN vírico en tejidos infectados se utiliza la hibridación *in situ* (Laroche y Magar, 1995, 1997; Laroche *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 1996; Sur *et al.*, 1996). Esta técnica sencilla permite diferenciar cepas mediante la correcta elección de las sondas. La transcripción inversa (RT) del ARN vírico junto a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se aplican fundamentalmente en muestras de suero y semen (Mardasi *et al.*, 1994; Suárez *et al.*, 1994; van Woensel *et al.*, 1994). Este método además, permite la diferenciación de genotipos, a través de oligonucleótidos adecuados y es posible aumentar la sensibilidad utilizando una doble PCR (RT-nPCR) (Christopher-Henning *et al.*, 1995b; Kono *et al.*, 1996; Wagstrom *et al.*, 2000). En 1996, Valícek *et al.* desarrollaron

un ELISA-PCR , que marca los productos del PCR con digoxigenina durante su obtención. Posteriormente se los hibrida con una sonda marcada con biotina y se revela mediante un ELISA.

El aislamiento del virus es la técnica de elección para confirmar la presencia del virus, sin embargo no se utiliza de forma rutinaria (Mengeling y Lager, 2000). El aislamiento puede realizarse a partir de órganos, aunque la muestra más adecuada es el suero de animales enfermos (van Alstine *et al.*, 1993). En los fetos o mortinatos, las muestras de líquidos, el pulmón, suero u órganos linfoides (Bloemraad *et al.*, 1994), son idóneos para el aislamiento; así como los MAP recogidos mediante lavado pulmonar (Mengeling *et al.*, 1995). Al igual que la técnica de PCR, la sensibilidad depende, entre otros factores, del tipo y condiciones en que fue recogida la muestra y la cepa del virus. Por otro lado, la actual difusión de las vacunas atenuadas (VA), que desencadenan una viremia de forma similar a las cepas de campo, hacen imposible la diferenciación entre ambos grupos de cepas, restando valor diagnóstico a este método.

Por ello, cada vez se hace más necesaria la identificación de las cepas del VSRRP, tanto para proveer de información en investigaciones epidemiológicas, así como para determinar la posible persistencia e importancia clínica de los virus vacuna en granjas vacunadas. En este sentido, se emplea el análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN producido por la digestión con enzimas de restricción (RFLP) (Gagnon y Dea, 1988; Wesley *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 1999a,b; Umthun y Mengeling, 1999).

En respuesta a las consecuencias clínicas del SRRP y a sus implicaciones económicas se han realizado grandes esfuerzos en investigación para desarrollar pruebas fiables de diagnóstico, así como en implantar algún tipo de medidas de control basadas en normas de profilaxis médica y sanitaria. En este sentido, el diagnóstico de animales portadores está estrechamente vinculado con la implantación exitosa de programas de prevención y control en granjas infectadas. Pero la identificación de estos animales *ante mortem* no es sencilla. Por un lado el virus persiste durante tiempo en ganglios linfáticos y amígdalas. Los ganglios quedan descartados para este tipo de diagnóstico, puesto que no es práctica su obtención, mientras que los raspados de amígdalas pueden ser útiles al respecto (Will *et al.*, 1997). La técnica de RT-nPCR comercial que detecta el VSRRP en estas muestras posee una sensibilidad muy baja (68,8%), lo que desemboca en una inadecuada identificación de los animales portadores (Wagstrom *et al.*, 1999; Zimmerman *et al.*, 2000).



### 1.8. Prevención y control

La prevención y control de SRRP se basa en la profilaxis higiénico-sanitaria y médica. Dentro de la primera, existen normas de carácter general para evitar la entrada de una enfermedad en una granja, que son totalmente extrapolables para el SRRP. No obstante, estas medidas por sí solas no impiden la extensión del SRRP, sobretodo en áreas con alta densidad de animales y con condiciones atmosféricas favorables para la supervivencia del virus y su diseminación vía aerógena. Otro aspecto importante a considerar es la introducción de animales a la granja. Las pruebas serológicas realizadas en las granjas de procedencia no siempre aseguran el estado real de las mismas, puesto que algunos animales pueden ser negativos, aunque la granja esté infectada. Por ello es aconsejable realizar una prueba serológica antes de la salida de los animales de la granja de origen y otra al final del período de cuarentena en la granja de destino. Una forma de mejorar, durante el período de cuarentena, la detección de animales infectados, es la introducción de animales susceptibles y realizar una exhaustiva vigilancia clínica de los mismos.

En granjas infectadas es importante conocer la zona donde el virus está activo, así como el patrón de transmisión dentro de la granja. Para ello, es útil la determinación del perfil serológico, mediante la aplicación de las técnicas de ELISA o IF a los sueros obtenidos mediante un muestreo transversal de los animales de la granja.

Si la infección alcanza a distintos grupos y la granja se encuentra en una zona donde el riesgo de reinfección es bajo, la repoblación con animales seronegativos suele tener éxito. Para ello, se debe vaciar la granja, lavar, desinfectar y aguardar un período de vaciado sanitario de 14 días antes de la introducción de los animales (Dee *et al.*, 1993, 1997a, 2000).

Cuando la recirculación del virus está entre los reproductores, Dee *et al.* (1994b) sugieren actuar a través de las cerdas de reposición. Para ello, se debe evitar la introducción de animales al menos durante 4 meses. El período de cuarentena y aclimatación debe durar de 25 a 60 días, ya que los períodos de viremia son muy largos en esta enfermedad. Las instalaciones para efectuar el aislamiento deben estar fuera de la granja, o al menos tener espacios aéreos independientes del resto de los animales. Sumado a ello, el manejo de la reposición debe seguir el sistema de "todo dentro - todo fuera" (*all in-all out*), limpiando y desinfectando entre los distintos grupos. En granjas

positivas, este período se aprovecha para inmunizar a los animales antes de incorporarlos al ciclo productivo.

Una vez controlada la circulación del virus entre los reproductores y si el virus está circulando en otro grupos de animales, una posibilidad es realizar una depoblación parcial. Ello consiste en una modificación temporal del flujo de animales, sacando de la granja el grupo etario en el que se cree que circula el virus, lo que permite realizar una limpieza y desinfección, a continuación se deja un período de vacío sanitario de las instalaciones. Lo más frecuente es que se lleve a cabo en las lechoneras, lugar donde habitualmente el virus está activo, rompiendo así el ciclo de transmisión de la enfermedad, de los animales más viejos a los más jóvenes y conseguir que los animales de cebo sean negativos (Dee y Yoo, 1994a; Kawashima *et al.*, 1994; Dee *et al.*, 1996a,b). Con este sistema se mejoran los datos de producción en las lechoneras, aunque raramente permite la erradicación del SRRP (Dee y Yoo, 1994a; Dee 1996; Dee *et al.*, 1997b). Este método es útil en zonas de alta densidad de animales y posee la ventaja de un costo relativamente bajo.

En EE.UU. se han utilizado los sistemas de Isowean®, el destete precoz segregado, medicado, unido a la implantación de sistemas de producción en múltiples sitios para intentar erradicar la enfermedad en granjas (Dee *et al.*, 1993; Christianson *et al.*, 1994; Loula, 1995). Está especialmente recomendado cuando la seroprevalencia en los reproductores es alta (Dee *et al.*, 1993) y es necesario que no haya lechones virémicos durante la lactación.

Otra forma de cortar la recirculación del virus es adoptando un sistema "todo dentro-todo fuera", donde los grupos de animales de una misma edad entran y salen a la vez de una zona de producción. Ello implica evitar el movimiento de aire entre las distintas salas, el contacto físico directo entre los animales y la adecuada limpieza y desinfección de las salas.

Por otra parte, para el control de la forma crónica del SRRP en la población de cerdos destetados, o bien para inducir una respuesta inmune en los animales es necesario contar con la profilaxis médica.

Desde el descubrimiento en 1991, tanto del agente causal del SRRP como de una línea celular permisiva al virus, se produjeron significativos avances en la elaboración de vacunas. Desde entonces, varios trabajos han demostrado el desarrollo de una inmunidad

protectora en animales vacunados contra el VSRRP (Gorcyca *et al.*, 1996b, Hesse *et al.*, 1996a,b; Mengeling *et al.*, 1996a; Plana Durán *et al.*, 1997b).

El uso de las vacunas despierta especial interés cuando se trata de aplicarlas a cerdas en producción, debido a que es necesario considerar la seguridad y eficacia que poseen para poder elaborar un plan de administración óptimo. En este sentido, para realizar una evaluación de las vacunas en cerdas reproductoras, existen dos criterios para determinar si confieren inmunidad protectora. El primero de ellos considera la existencia o no de infección transplacentaria tras el desafío con cepas virulentas, en tanto que el otro tiene en cuenta la viremia y/o la recuperación del virus desafío en los lavados pulmonares (Lager y Mengeling, 1997). Además de ello se consideran los parámetros productivos de la cerda, tales como número de lechones nacidos vivos, nacidos muertos, lechones momificados, lechones muertos durante la lactación y lechones destetados, principalmente. El diseño más extendido es aquel donde los animales se vacunan antes de la cubrición y se desafían mediante la inoculación intranasal de virus campo, entre los días 87 y 92 de gestación, cuando los fetos son altamente susceptibles a la infección (Lager y Mengeling, 1997).

En la actualidad, existen tanto VA como vacunas inactivadas (VI) y la mayoría de los estudios publicados refieren a las VA con el subtipo americano.

La primera vacuna comercializada se desarrolló en España por el laboratorio Cyanamid con el nombre de *Cyblue*<sup>®</sup>. Contiene una cepa española del VSRRP obtenida en cultivos de MAP, posteriormente inactivada y administrada en adyuvante oleoso. Esta forma de elaboración dificultó la introducción del inmunógeno en otros países, debido al riesgo de que pudiera acarrear otros agentes infecciosos. La vacuna estaba orientada a prevenir los problemas asociados con la reproducción en cerdas, recomendándose la administración de dos dosis con un intervalo de 21 días, evitando que fuese 10 días antes o después de la cubrición y 10 días antes del parto y revacunación durante la lactación. En cerdas de reposición se aconsejaba la vacunación a los 6 meses.

Los estudios de eficacia realizados por Plana Durán *et al.* (1997b), arrojaron una protección del 70% en relación a la prevención de las alteraciones reproductivas, cuando las cerdas vacunadas fueron desafiadas, entre los días 67 y 84 de gestación, con una cepa homóloga del VSRRP, entre el día 67 y 84 de gestación, en relación con los controles no vacunados. Asimismo, el grupo de cerdas control mostró un alto porcentaje de repeticiones

cíclicas después del parto y mayor número de mortandad de lechones durante la lactación. La producción de anticuerpos tras la vacunación fue muy limitada, no obstante en aquellos animales donde no se detectaron anticuerpos al momento de la contraprueba resultaron estar protegidos. Esto posiblemente estaría indicando el desarrollo de una inmunidad de base celular. En estudios posteriores se observó que la vacuna no impedía la viremia ni el paso a través de la barrera placentaria (Prieto *et al.*, 1997a). Pruebas de campo con esta vacuna sugieren un beneficio significativo debido a la disminución de las repeticiones, abortos y lechones nacidos muertos así como al aumento del número de lechones nacidos vivos y lechones destetados por cerda y año (Plana Durán, 1997b).

Posteriormente, los laboratorios Merial, realizaron una vacuna inactivada con adyuvante oleoso, denominada *Progressis*<sup>®</sup>. Este producto contiene una cepa del subtipo europeo aislada durante un brote de SRRP en Alemania. El esquema de vacunación recomendado en reproductoras es la administración de dos dosis, con un intervalo de 3 semanas y un refuerzo a la mitad de cada gestación. Recientemente, Alno *et al.* (2000) realizaron pruebas de campo, mediante la vacunación de granjas con diferentes estados sanitarios en relación al SRRP. Estos autores concluyeron que la vacuna podría considerarse una herramienta eficiente para mejorar el rendimiento productivo en piaras donde el VSRRP circula más activamente. Similares resultados fueron obtenidos por Reynaud *et al.* (2000), en una prueba de campo donde utilizaron 1514 cerdas primerizas y 3366 cerdas multíparas, e inmunizando al 69% de las mismas.

Por su parte, en EE.UU, los laboratorios Bayer, elaboraron un inmunógeno inactivado a partir de una cepa americana del SRRP, denominado *PRRomiSe*<sup>®</sup>. Los estudios de seguridad y eficacia llevados a cabo en hembras demostraron que en los animales vacunados la viremia posterior a la inoculación de una cepa virulenta era más corta y afectaba a un número muy reducido de animales, en relación con el grupo control. Asimismo, el grupo de animales inmunizados arrojó mejores índices productivos que los controles, principalmente en relación al número de lechones nacidos vivos normales.

Paralelamente se desarrollaron VA., que tuvieron amplia difusión debido a que inducen una inmunidad mayor y más duradera. Desde el año 1994, los laboratorios Boehringer Ingelheim lanzaron al mercado estadounidense la vacuna *RespPRRS*<sup>®</sup>, a la que denominaron en el resto del mundo *Ingelvac PRRS MLV*<sup>®</sup>. Este producto está elaborado con la cepa de referencia americana del VSRRP, la ATCC VR-2332, atenuada mediante pases sucesivos en la línea CL 2621. La comercialización se inició en el año 1994 y se

destinó a cerdos de 3 a 18 semanas de vida (Gorcyca *et al.*, 1995a; Sandford y Nuhn, 1996; Lager y Mengeling, 1997). Posteriormente, se modificó la licencia en EE.UU. extendiéndose su aplicación, bajo el nombre de *RespPRRS/Repro<sup>TM</sup>*, a hembras no gestantes para controlar los problemas asociados a la reproducción (Lager y Mengeling, 1997).

En este tipo de vacunas con virus modificados, además de comprobar la eficacia que posee, ya sea en reproductores o en lechones, es importante evaluar la seguridad que brinda. Esto último hace referencia a la posibilidad de eliminación y persistencia del virus vacuna en los animales y por tanto en la población, así como a la posibilidad de aumentar la virulencia y causar enfermedad en algún momento. De esta forma, se observó una viremia bastante prolongada en lechones que recibieron RespPRRS<sup>®</sup>, detectándose un 30% de cerdos virémicos 25 días después de la inmunización. Por otra parte, y a diferencia de las vacunas inactivadas, brinda una protección efectiva ante el desafío con cepas virulentas, medida por el acortamiento del período virémico y un menor número de animales afectados (Gorcyca *et al.*, 1995a). Sumado a ello, diversos estudios a nivel experimental o de campo, demostraron la efectividad del inmunógeno en la prevención de los signos clínicos asociados al SRRP, con disminución de la leucopenia y lesiones pulmonares. También es capaz de limitar la difusión de cepas virulentas ya que aumenta el umbral de dosis infectivas necesarias para producir una infección y disminuye la magnitud y duración de la eliminación del virus. De esta forma, el 40% de los animales centinelas puestos en contacto con animales vacunados y contraprobados con una cepa virulenta no seroconvirtieron en un período de 28 días (Gorcyca *et al.*, 1995a y b; Kang *et al.*, 1996).

Después de la inmunización con RespPRRS<sup>®</sup>, se pueden detectar anticuerpos mediante IFI o ELISA a partir de la segunda semana después de la vacunación, y por seroneutralización a partir de la cuarta semana. Estos anticuerpos poseen una duración media de entre 112 y 118 días y son indistinguibles de aquellos inducidos por cepas campo del VSRRP (Gorcyca *et al.*, 1995a; Roof *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1996). Gorcyca *et al.* (1995a), describieron una respuesta inmune secundaria al desafío de animales vacunados, a partir del día 7 p.i. Además, esta vacuna da lugar al desarrollo de una respuesta inmune de base celular, caracterizada por una proliferación de linfocitos T y una respuesta de sensibilidad retardada que tiene el mismo patrón que en animales infectados con cepas virulentas (Bautista *et al.*, 1996b).

En animales reproductores, el virus vacuna también produce una viremia detectable, aunque de menor duración que en los controles, pudiendo además eliminarse

por distintas vías (Gorcyca *et al.*, 1997b; Lager y Mengeling, 1997). Bajo condiciones experimentales se ha observado infección transplacentaria, con el nacimiento de lechones infectados pero clínicamente normales (Lager *et al.*, 1996a, 1997b). Estudios de seguridad efectuados en cerdas seronegativas vacunadas en el último tercio de la gestación, ya sea con la dosis recomendada o 10 veces superior, parecen indicar que no da lugar a alteraciones de la reproducción (Gorcyca *et al.*, 1997a).

En relación a las pruebas de eficacia, los resultados hallados en la literatura son dispares y ello obedece a que la eficacia de la vacuna depende del tipo de cepa con que se realice el desafío. De esta forma, hay una mayor protección hacia cepas homólogas que contra aquellas heterólogas (Gorcyca *et al.*, 1996b, 1997a; Lager y Mengeling, 1997). Lager y Mengeling (1997) reseñan que la vacuna confiere una inmunidad protectora ante el desafío con cepas homólogas que dura al menos 600 días. También se produce una protección cruzada, con cepas antigénicamente similares, que se inicia dentro de las cuatro semanas siguientes a la vacunación y aumenta con el tiempo hasta al menos los 5 ó 6 meses siguientes. Mientras que con cepas heterólogas antigénicamente diferentes no siempre se produce dicha inmunidad y en todo caso depende de la cepa que se esté analizando. Esta situación también se puede extrapolar a otros ámbitos, tales como las alteraciones reproductivas o signos clínicos asociados al SRRP. Cuando la inoculación se realiza con cepa heteróloga se observa una protección parcial de la vacuna en relación a los problemas asociados a la reproducción, con un 15% de lechones que nacen infectados y un 8% presenta anticuerpos contra el virus (Gorcyca *et al.*, 1997a).

Existe controversia en relación a la protección que brinda la vacunación de reproductores frente a la infección de lechones tras el nacimiento. Gorcyca *et al.* (1996a) observaron la presencia de anticuerpos neutralizantes de origen maternal a las 4-5 semanas de vida, los que le confieren cierta protección contra la enfermedad, traducida en un menor porcentaje de viremias, menor nivel de leucopenia, y disminución de los signos clínicos asociados. Sin embargo, los trabajos efectuados por Mengeling *et al.* (1996a) no evidencian diferencias entre lechones procedentes de cerdas vacunadas y sin vacunar cuando son inoculados a las 2-3 semanas de vida con cepas virulentas.

Los efectos que esta vacuna puede tener sobre los verracos no están claros. Al igual que en cerdas y lechones, se produce una disminución del período virémico después del desafío con una cepa virulenta y una reducción o ausencia de la eliminación del virus virulento después del desafío. Sin embargo, algunos autores no fueron capaces de detectar

el virus en semen (Nielsen *et al.*, 1997), mientras que en otros casos se demostró su presencia hasta 39 días después de la inmunización (Shin *et al.*, 1997; Christopher-Hennings *et al.*, 1996). En relación al efecto que posee sobre la calidad espermática, la bibliografía hallada es igualmente variable. Nielsen *et al.* (1997) no hallaron diferencias en cuanto a la calidad espermática después de la vacunación, mientras que en otros casos se observó una calidad espermática inferior a la óptima, debido fundamentalmente, a una disminución de la motilidad progresiva y un aumento de las formas anormales (Christopher-Hennings *et al.*, 1997).

En EE.UU., esta vacuna fue empleada en reproductores incluso antes de obtener la licencia oficial para tal fin. De esta forma, se la utilizó en cerdas de reposición seronegativas destinadas a granjas que habían padecido la enfermedad o donde se había comprobado que la infección con el VSRRP era activa en los reproductores, aunque no existieran alteraciones asociadas a la reproducción (Dee, 1997, Dee *et al.*, 1997c). No obstante, Loula (1996) sugiere que este tipo de vacunas no tienen la suficiente seguridad para aplicarse en hembras en reproducción, puesto que en ocasiones se observó un aumento en el número de lechones nacidos débiles, nacidos muertos y momificados, así como una disminución de la tasa de partos después de la aplicación de RespPRRS®. Estos hechos dejan en entredicho la seguridad de esta vacuna en dichas prácticas.

Para tratar de aminorar dicho inconveniente, se practicaron distintos protocolos de vacunación. Una de las pautas consistió en la vacunación cada tres meses, aumentando de esta forma la presión que se ejerce sobre el virus campo y favoreciendo la rápida eliminación de todas las subpoblaciones del VSRRP. El problema se presentó en aquellas cerdas en el último tercio de la gestación, donde el virus vacuna fue capaz de atravesar la placenta, dando lugar al nacimiento de lechones infectados capaces de transmitir el virus. Para evitar esto, se ensayó otro modelo denominado "6/60", que preveía la vacunación al 6º día post-parto y/o a los 60 días de gestación. De esta forma se mejoraban los aspectos de seguridad en detrimento de la presión ejercida sobre el virus campo. Una tercera forma de aplicación, se basó en la cinética de la inmunidad de base celular. Consiste en vacunar a todos los animales que estén por debajo de los 70 días de gestación y aquellas cuya gestación sea más avanzada, inmunizarlas a los 7 días del parto. A los 30 días se aplica una 2º dosis siguiendo el mismo protocolo y para mantener un estado inmunitario elevado se vacuna a todas las cerdas a los 7 días post-parto. Con este sistema se eliminan rápidamente las subpoblaciones del virus campo y se evitan los efectos secundarios durante el último tercio de la gestación (Dee, 1996).

En Europa, *Ingelvac PRRS MLV*<sup>®</sup>, obtuvo en 1996 la licencia de comercialización en Alemania, Holanda y Dinamarca (Bøtner, 1997; Bouwkamp, 1999). En Dinamarca en 1996 se implantó un programa de control voluntario para prevenir y/o reducir la diseminación del SRRP. Ello supuso conocer el estado serológico de las granjas y vacunar las positivas. De esta forma se inmunizaron, unas 1000 granjas que compartían un perfil serológico propio de una infección crónica, con bajos títulos de anticuerpos en reproductores y altos en cerdos de cebo, unido a la ausencia de casos agudos de SRRP. El blanco de la vacunación fueron los cerdos de entre 3 y 18 semanas de vida, dado que era el único grupo de edad donde *Ingelvac PRRS MLV*<sup>®</sup> poseía licencia para ser aplicada. Entre 2 y 3 meses después, aparecieron en varias granjas, síntomas agudos similares al SRRP, incluyendo aumento del número de abortos, incremento de los mortinatos y lechones muertos durante la lactación. El VSRRP aislado a partir de muestras de fetos y de mortinatos en más de 100 granjas correspondió al virus vacuna, indicando la diseminación de dicho virus desde los cerdos vacunados a las reproductoras no vacunadas, dejando nuevamente en entredicho la seguridad de la vacuna.

Por otra parte, a mediados del año 1996 obtuvo la licencia en EE.UU. una vacuna con virus modificado, comercializada por los laboratorios Schering-Plough Animal Health, con el nombre de *Prime Pac PRRS*<sup>®</sup>. Está elaborada a partir de una cepa americana y destinada a prevenir los problemas asociados a la reproducción que produce el SRRP. Estudios experimentales sobre la eficacia de este inmunógeno realizados por Hesse *et al.* (1996a, b) concluyeron que el virus vacuna reunía las condiciones de seguridad después de su administración, que no inducía viremia pero sí anticuerpos neutralizantes, en un total de 43 cerdas analizadas. La vacuna brinda protección contra el desafío homólogo, no obstante ante un virus heterólogo no previene la infección, registrándose animales virémicos. De la misma forma los datos productivos mejoran sustancialmente cuando se emplea la vacuna y el desafío se realiza con cepas homólogas. En tanto que las pruebas realizadas para la obtención de la licencia se observó una disminución del apetito de corta duración en el 1,8% de las cerdas inmunizadas y ninguno de los 1467 lechones inoculados presentaron reacciones adversas.

Esta vacuna no está autorizada para su uso en lechones y verracos. No obstante, Hesse *et al.* (1997) llevaron a cabo un estudio para valorar la eficacia en la prevención de los problemas respiratorios asociados al SRRP. Dichos autores observaron un período de viremia posterior a la vacunación, de menor duración, que da lugar a la eliminación del virus. De esta forma se llegaron a infectar un 20% de cerdos centinelas que convivían con los



vacunados. A partir de los 14 días después de la administración del inmunógeno se detectaron anticuerpos neutralizantes. Cuando los animales fueron inoculados con una cepa homóloga 4 semanas después, la viremia fue más corta y no se produjo transmisión horizontal del virus. Asimismo, los signos clínicos y lesiones asociadas al SRRP experimentaron una reducción estadísticamente significativa en relación con los controles no inmunizados. Cuando estos mismos autores realizaron la inoculación con virus heterólogo observaron una mejoría global de los distintos parámetros en relación a los animales no vacunados, aunque fue menor que en el caso anterior.

Hutchinson *et al.* (1997) realizaron un estudio vacunando verracos con dosis 200 veces superiores a las utilizadas en cerdas. Los animales no presentaron signos clínicos, pero se detectó un 25% de verracos virémicos. El 50% de dichos animales eliminaron el virus vacunal por semen, aunque no más allá de los 17 días posteriores a la vacunación (p.v.) y no se observaron alteraciones en la calidad espermática. Después de la inoculación con una cepa virulenta, no detectaron viremia, ni eliminación del virus por semen, así como tampoco alteraciones significativas en la calidad espermática, en el grupo de animales inmunizados previamente.

Recientemente, los laboratorios Ford Dodge obtuvieron en EE.UU. la licencia para comercializar una vacuna atenuada contra el SRRP. Srinivasappa *et al.* (1999) llevaron a cabo estudios experimentales con esta vacuna en lechones y hembras reproductoras. Estos autores concluyeron que la vacuna es segura para utilizarla en animales de 3 meses o mayores y que no causa efectos adversos en cerdas. Tampoco observaron signos clínicos ni lesiones pulmonares en los lechones vacunados. En relación a la seguridad de esta vacuna, en lechones se demostró que era totalmente inocua aún cuando era administrada por encima de 100 veces la dosis normal. De igual forma, la administración del inmunógeno a dosis simple, repetida o en sobredosis a cerdas en avanzado estado de gestación, no produjo efectos adversos.

Estudios realizados por Osorio *et al.* (1998) comparando tres vacunas comerciales, disponibles en el mercado de EE.UU., en cuanto a su capacidad de inducir protección contra cepas de elevada virulencia del VSRRP, concluyeron que dichas vacunas conferían protección contra las manifestaciones clínicas de la enfermedad, pero no contra la infección. Por otra parte, Mengeling *et al.* (1999a) advierten sobre la posibilidad de que el virus vacunal, bajo ciertas condiciones, pueda persistir, mutar y eventualmente producir una significativa infección en los cerdos.

En cuanto a las vacunas elaboradas con el serotipo europeo, además de las inactivadas citadas anteriormente, deben añadirse aquellas que llevan virus modificado. Entre estas últimas se encuentra la elaborada por los laboratorios Intervet Internacional BV, *Porcili PRRS*<sup>®</sup>, y las producidas por los laboratorios españoles Hipra S.A. y Syva S.A, denominadas *AmervacPRRS*<sup>®</sup> y *Pyrsvac-183*<sup>®</sup>, respectivamente.

Recientes ensayos empleando el inmunógeno *Porcili PRRS*<sup>®</sup> para evaluar su eficacia en animales de cebo, demostraron que cuando era administrada a lechones de 6 semanas, reducía los signos clínicos y las lesiones pulmonares asociadas al SRRP, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, a la vez que mejoraba el rendimiento de los lechones después del destete, medido por los índices de conversión alimentaria, ganancia de peso y días al matadero, siempre en relación al grupo control no vacunado (Kritas *et al.*, 1999; Mavromatis *et al.*, 1999; Pejsak *et al.*, 2000). Estudios comparativos entre la eficacia de Ingelvac PRRS MLV<sup>®</sup> y *Porcili PRRS*<sup>®</sup> demostraron que la viremia es más efectivamente reducida cuando el desafío es con una cepa homóloga. En tanto que la protección hacia una cepa heteróloga fue menor y solamente se observó una reducción estadísticamente significativa en la viremia en los animales vacunados con *Porcili PRRS*<sup>®</sup> y contraprobados con el virus campo tipo americano y no al revés (Van Woensel *et al.*, 2000).

El producto *Pyrsvac-183*<sup>®</sup> contiene una cepa española del VSRRP (All 183), que fue aislada en Murcia y atenuada por 183 pases en células de la línea Swine Testis. Este producto, lanzado al mercado en el año 1996, posee licencia para ser administrado a cerdos menores de 18 meses. Estudios experimentales realizados en cerdas demostraron que el virus vacuna produjo un corto período de viremia acompañado de eliminación por distintas vías, aunque con bajos títulos, no alcanzando a inducir seroconversión en animales centinelas. Asimismo se muestra que la cepa vacunal no produce infecciones transplacentarias desde la mitad al final de la gestación, de la misma forma que no se observaron cuando dichas cerdas fueron contraprobadas con el virus campo (Llanos *et al.*, 2000).

La otra vacuna española, *AmervacPRRS*<sup>®</sup>, está elaborada con una cepa aislada en Girona en 1991, denominada 5710 y adaptada mediante 20 pases sucesivos en cultivo de células de la línea MA-104, asignándole el nombre de VP-046bis. A igual que la vacuna precedente, la licencia está otorgada para su empleo en animales menores de 18 meses. Fuera de las condiciones de registro administrativo, no se conoce nada acerca de la

seguridad y eficacia de este producto para proteger frente a las alteraciones de la reproducción inducidas por el VSRRP.

La reciente aparición de brotes atípicos o agudos de SRRP reflejan la necesidad, no sólo de mayores conocimientos sobre la biología del virus, sino también el desarrollo de vacunas más efectivas, dado que en la mayoría de las granjas afectadas por dichos brotes, se habían implantado pautas vacunales (Bell, 1998; Lager *et al.*, 1998). Actualmente, se están llevando a cabo experimentos tendentes a producir cepas del VSRRP modificadas avirulentas que puedan ser utilizadas como vacuna. Plana Duran *et al.* (1997a) publicaron un ensayo de vacuna recombinante, obteniendo el antígeno en un sistema de expresión de células de insecto infectadas con baculovirus, que expresan las proteínas codificadas por las ORF3, ORF5 y ORF7, o bien una mezcla de todas ellas. Los mejores resultados productivos en cerdas, medidos por supervivencia de lechones, los obtuvieron con el producto que incluye las tres proteínas mencionadas. Trabajos más recientes del mismo grupo (Plana Durán *et al.*, 2000) exponen la investigación realizada para el desarrollo de nuevas vacunas con vectores autolimitantes utilizando el virus de la gastroenteritis transmisible porcina (coronavirus) defectivo para expresar las 3 proteínas del VSRRP anteriormente citadas. Por su parte, Gagnon *et al.* (1999), emplearon un sistema similar al mencionado, pero utilizando un adenovirus defectivo en su replicación para expresar las proteínas N y GP5 de la cepa canadiense IAF-Klop del VSRRP, en cultivos celulares y de forma inducible. Ensayos preliminares llevados a cabo en ratones permitieron detectar una respuesta humoral significativa frente a la proteína N. Por el momento, estas vacunas de nueva generación están en fase experimental y resta aún determinar el comportamiento que presentarán en los cerdos.

## II. Justificación y Objetivos.

En la actualidad y como ya fueran presentadas en el apartado anterior, existen vacunas disponibles en el mercado, sin embargo su eficacia varía en función de las cepas del VSRRP (Lager y Mengeling, 1997; Plana Durán *et al.*, 1997b; Christopher-Hennings *et al.*, 1997; van Woensel *et al.*, 1998; Osorio *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 1999a,b,c).

Las vacunas inactivadas contra el SRRP tienen una reducida difusión, principalmente debido a que brindan una protección muy limitada y únicamente han presentado algún efecto beneficioso al mitigar las signos del SRRP. En países como EE.UU. solamente fueron utilizadas de forma experimental, sin embargo, alcanzaron gran difusión en otros países, como España, sobretodo al principio de su comercialización.

La introducción de las vacunas atenuadas frente al SRRP, supuso un avance en la profilaxis y control de la enfermedad. Sin embargo, y a pesar del beneficio potencial de su aplicación, se ha generado un controvertido debate en términos de seguridad y eficacia. Ello viene determinado por diferentes aspectos, unos derivados de las propias características biológicas del virus y otros inherentes al conocimiento que hoy día se tiene del comportamiento clínico de la vacuna comercializada ampliamente en EE.UU. y ciertos países europeos.

Entre las características del virus, es necesario tener en cuenta las diferencias antigénicas y genotípicas entre los aislados americanos y europeos y entre las distintas cepas, fundamentalmente dentro del subgrupo europeo. Dicha variabilidad puede dar lugar a la existencia de cambios muy bruscos en la virulencia, provocando que las vacunas no sean capaces de proteger adecuadamente frente a cepas heterólogas. Otra característica importante del VSRRP es su capacidad de producir infecciones persistentes durante semanas o meses en presencia de anticuerpos frente al virus. Dichos anticuerpos no son, aparentemente, protectivos y el desarrollo de inmunidad protectora, medida por anticuerpos neutralizantes o inmunidad de base celular, tarda más tiempo en desarrollarse.

Por otro lado, dentro del conocimiento que se tiene en la actualidad sobre estas vacunas, principalmente las elaboradas con el subgrupo americano, figuran aspectos negativos que cuestionan principalmente la seguridad de su uso. Entre dichos puntos, podemos citar la capacidad de la cepa vacunal de persistir durante semanas en el organismo del animal inmunizado (Mengeling *et al.*, 1996b), transmitirse a otros animales susceptibles (Torrison *et al.*, 1996; Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1998), o bien

transmitirse vía congénita e inducir persistencia del virus en lechones (Mengeling *et al.*, 1996c). Sumado a todo ello, está la controversia existente sobre la capacidad protectora de los anticuerpos vacunales tras pasados a los lechones vía calostro y la eficacia frente a la infección con virus heterólogos. Asimismo, existe la posibilidad que la cepa vacunal altere la calidad espermática y pueda eliminarse vía semen (Christopher-Hennings *et al.*, 1997).

A ello se suma la probabilidad de que el virus vacuna sufra un proceso de evolución genética o bien algún tipo de recombinación con las cepas de campo que circulan dentro de las granjas con infección crónica desembocando en una reversión hacia fenotipos más virulentos (Meng, 2000). Esto guarda relación con los brotes atípicos o agudos de SRRP, generalmente sucedidos en granjas donde se llevaban a cabo programas de vacunación con VA (Bell, 1998; Lager *et al.*, 1998)

En España este tipo de vacunas se están empleando masivamente en reproductores, a pesar de la falta de conocimiento de los niveles de seguridad y eficacia que poseen en dichos animales. Ante los antecedentes expuestos sobre el comportamiento de las vacunas del subgrupo americano del VSRRP, cabría la posibilidad de que los inmunógenos fabricados en España acarrearán los mismos problemas que han planteado las vacunas mencionadas precedentemente.

Por su parte, las vacunas de nueva generación son muy prometedoras en cuanto a eliminar los problemas asociados con los inmunógenos atenuados, sin embargo hasta el presente estos productos continúan en fase experimental y en consecuencia no es factible emplearlos en la profilaxis y control del SRRP. Por tanto, sólo disponemos de las vacunas clásicas para hacer frente a la enfermedad y para poder hacer un uso racional de ellas es necesario conocer minuciosamente su comportamiento.

En base a ello, nuestra atención se centró en conocer el potencial de seguridad y eficacia de las vacunas comercializadas en España, mediante el planteamiento de dos objetivos particulares:



**A. Estudio de la eficacia en hembras gestantes de las vacunas frente al VSRRP elaboradas en España (AmervacPRRS®, Pyrsvac-183® y Cyblue®).**

El desarrollo de este objetivo pretende obtener respuestas a la capacidad que puedan tener estos productos vacunales para prevenir las alteraciones reproductivas inducidas por la infección con el VSRRP. Además, permitiría conocer si previenen la infección transplacentaria después de la exposición de estos animales al virus campo durante el último tercio de la gestación, así como si impiden la transmisión de estos virus a los lechones durante el período de lactación.

**B. Estudio de seguridad en cerdas gestantes de las cepas VP-046 BIS y ALL-183 del VSRRP incluidas en las vacunas modificadas AmervacPRRS® y Pyrsvac-183®.**

A través de este objetivo se procurará dar respuesta a preguntas ya planteadas que hacen referencia a la posible capacidad de las cepas vacunales de atravesar la barrera placentaria en hembras durante el último tercio de la gestación, provocando infecciones congénitas y la aparición de signos clínicos caracterizados por abortos, acortamiento del período de gestación, aumento del número de lechones nacidos muertos y nacidos débiles, principalmente.

Asimismo, mediante este experimento se procurará obtener respuestas de cómo las infecciones congénitas en lechones afectan la supervivencia y la tasa de crecimiento de los individuos, procedentes de madres vacunadas o de las madres control.

### **III. Materiales y Métodos**



### 3.1 Cultivos celulares

#### 3.1.1 Cultivos de MAP

Los macrófagos alveolares se obtuvieron de lechones de entre 3 y 5 semanas de vida procedentes de una granja libre de PRRS. Los animales, previa administración intramuscular de 0,1gr de azaperona (Stresnil®, Laboratorios Esteve), se sacrificaron por sección de la vena yugular, permitiendo una sangría a muerte. Inmediatamente después, los pulmones se extrajeron asépticamente, se obliteró la entrada de la tráquea con una pinza de Crile para evitar su contaminación y se los trasladó a la cabina de flujo laminar. Una vez allí, se realizaron 3 lavados con solución salina tamponada estéril (PBS) a una concentración de 137 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merk); 2,68 mM de KCl (Merk); 147 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merk) y 16,3 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merk) con pH de 7,2-7,3 y suplementada con una mezcla antibiótica cuya concentración final contenía 200UI/ml de penicilina G sódica, 200 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 0,5 µg/ml de anfotericina B (Biowhittake). Los lavados se realizaron con una bomba peristáltica que permitió el ingreso por la tráquea de 300 ml de PBS, aproximadamente. A continuación, el líquido se extraía con la ayuda de la misma bomba y masajes en la superficie del pulmón para facilitar el desprendimiento de los MAP. El líquido recuperado se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. Las células contenidas en el sedimento se lavaron en medio de cultivo celular esencial mínimo, preparado con sales de Eagle y modificado por Dulbecco (DMEM) (Biowhittake), suplementado con la misma mezcla antibiótica citada anteriormente. Con la ayuda de una pipeta estéril se resuspendió bien el sedimento y luego se centrifugó nuevamente en las condiciones arriba citadas. A continuación se descartó el medio y el sedimento se resuspendió en 50 ml de DMEM, de los cuales se tomaron 100 µl para hacer dos diluciones, 1/10 y 1/100, a fin de realizar el recuento de células en cámara de Thoma. El número celular se ajustó a la concentración deseada con DMEM suplementado con doble concentración de antibióticos y un 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowittake). Para los diferentes soportes se emplearon las siguientes concentraciones celulares:

- Placas de cultivo celular de 96 pocillos:  $2,6 \times 10^7$  células totales en un volumen de 150 µl/pocillo de DMEM.
- Frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> de superficie:  $2,6 \times 10^7$  células totales en 10 ml de DMEM.
- Frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> de superficie:  $9 \times 10^7$  células totales en 30 ml de DMEM.

Una vez distribuidas las células en los soportes se incubaron en estufa a 37°C y en atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$  hasta su utilización.

### **3.1.2 Línea celular MARC-145**

Las células MARC-145 proceden de un clon estable de la línea MA-104 (riñón de mono) (Kim *et. al.*, 1993). Para cultivarlas se emplearon frascos de cultivo de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie, a una concentración de  $2 \cdot 10^6$  células/ml, con "Eagle Minimum Essencial Medium (EMEM) (Biowhittake) suplementado con antibiótico y 8% de SFB. El crecimiento se realizó en estufa de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento de la línea se realizaron pases seriados mediante desprendimiento del tapiz confluyente, de 4-5 días de desarrollo, con tripsina-versene 0,25% (Gibco-BRL). Una vez desprendido, se neutralizó la tripsina con 0,5ml de SFB y se centrifugó a 600 g durante 10 minutos a 18°C. El sedimento se resuspendió en la cantidad adecuada de EMEM , según la concentración deseada.

## **3.2 Virus empleados**

### **3.2.1 Producción de los lotes de virus utilizados**

Para producir los diferentes lotes de virus se sembraron MAP en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (TPP) y se dejaron durante 5-6 horas aproximadamente. Posteriormente se descartó el medio de cultivo y se agregó el virus deseado, a una multiplicidad de infección de 0,01 y luego de una hora de adsorción, en las mismas condiciones arriba citadas, se le añadió 10 ml de DMEM suplementado con antibiótico y un 10% de SFB. Los cultivos se observaron diariamente y cuando un 80-90% de las células mostraron ECP característico del virus, los frascos se congelaron a -80°C. Posteriormente se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación para luego realizar una centrifugación a 600 g a 4°C, durante 10 minutos, a fin de separar los detritos celulares. El sobrenadante así obtenido se alicuotó y almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

Los virus del SRRP empleados pertenecían al subgrupo europeo (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas del VSRRP empleadas en la inoculación experimental de las cerdas.

Cepas	País de origen	Año
92VO58	Bélgica	1994
5710	España	1991
VP035	España	1995
A4	Francia	1994
A5	Francia	1995
L3.1	Holanda	1992
NL4.2	Holanda	1993
2156	Italia	1992

(Suarez *et al.*, 1996b.)

La titulación de los virus se realizó por triplicado en MAP, utilizando tres lotes diferentes de células. Del promedio de dichas titulaciones se obtuvo el título vírico final.

### 3.2.2 Titulación de los virus

Los lotes de virus empleados, así como ciertas muestras clínicas positivas al aislamiento de virus se titularon mediante diluciones seriadas de base 10 (de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ), empleando como diluyente el medio de cultivo DMEN. Estas diluciones se inocularon en microplacas de cultivo de 96 pocillos sembradas con MAP (inciso 3.1.1), a las cuales se le descartó el medio de cultivo y se les agregó 100  $\mu$ l de DMEM suplementado con 10% de SFB y antibiótico. Posteriormente se inoculó el virus, depositando 100  $\mu$ l por pocillo y utilizando una columna para cada dilución. En cada placa se dejó una columna de control de células con 200  $\mu$ l de DMEM.

Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire, realizando diariamente la lectura de las placas hasta el día 5 p.i. para observar el ECP producido por el virus. El título del virus se calculó según el método de Reed y Muench (1938), expresándose como DI<sub>50</sub>CT/ml o gr.

Para la titulación del virus contenido en las vacunas atenuadas se empleó el mismo lote que el utilizado en la vacunación de los animales. En este caso la titulación se realizó en cultivos de MAP y sobre la línea celular MARC-145.

Cuando se emplearon las células MARC-145, se procedió esencialmente de la misma forma, salvo que el cultivo celular tenía entre 12 y 24 horas, habiendo sembrado las células a una concentración de entre  $1-3 \times 10^5$  células/ ml (10.000 -30.000 células / pocillo).

### **3.2.3 Aislamiento de virus a partir de muestras clínicas**

De las muestras clínicas obtenidas en los distintos experimentos se intentó el aislamiento de virus en cultivos de MAP. Estos cultivos se prepararon en la forma descrita en el apartado 3.1.1, utilizando microplacas de cultivo de 96 pocillos (TPP). Transcurridas 5-6 horas de la siembra inicial de MAP, se descartó el medio de cultivo y se añadieron las muestras por cuatuplicado, colocando 100 µl de cada muestra por pocillo y permitiendo un período de adsorción de 1,5 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar dicho tiempo, se añadió 100 µl de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB. Después de 4-5 días de incubación se realizó la lectura de las placas para observar ECP compatible con VSRRP. Al finalizar la lectura del 5º día, se realizó un segundo pase en cultivos de MAP. Para ello, las placas se congelaron y descongelaron 3 veces, los restos celulares se eliminaron mediante una centrifugación a 600 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se inoculó de la misma forma descrita anteriormente en cultivos frescos de MAP. Al cabo de 5 días se observó la posible presencia de ECP.

Todas las placas inoculadas contenían 8 pocillos control negativo, distribuidos en las columnas centrales. En ellos se añadían 200 µl de DMEM suplementado con antibiótico y 10% de SFB. Asimismo, se colocaron 8 pocillos control positivo, procedentes de animales inoculados experimentalmente, distribuidos entre las muestras. Para poder determinar la sensibilidad de los MAP al VSRRP, en cada lote de macrófagos se inocularon pocillos con la cepa 5710 en diferentes concentraciones.  $10^4$ ;  $10^3$ ;  $10^2$ ;  $10$ ;  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  DI<sub>50</sub>CT/ml. Solamente se utilizaron aquellos lotes de MAP que mostraron una sensibilidad de al menos el 90% para captar las 100 DI<sub>50</sub>CT/ml.

En determinadas muestras de suero procedentes de las cerdas, además de la utilización de cultivos de MAP para intentar el aislamiento del VSRRP, se utilizaron células de la línea MARC-145.

EL ECP obtenido en cultivos de MAP o en la línea MARC-145, fue contrastado mediante la técnica de RT-PCR. Para ello, se escogieron al azar un determinado número de muestras con ECP en cada placa que fueron procesadas por dicha técnica.

### 3.2.4 Confirmación del VSRRP mediante la técnica de RT-PCR

La técnica de RT-PCR se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Suárez *et al.* (1994), con algunas modificaciones.

i) Aislamiento del ARN del virus. Para ello se utilizaron 200 µl de una resina sintética (Chelex®) al 5% en H<sub>2</sub>O-DPEC, a la que se le añadieron 200 µl de la muestra a analizar. La mezcla así obtenida se incubó 30 minutos a 56°C, en baño maría. Posteriormente, se agitó vigorosamente y se la colocó en baño maría a 100°C durante 8 minutos. Previa agitación, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 3 minutos a temperatura ambiente.

ii) Transcripción reversa del ARN. Para cada reacción se mezclaban en un tubo 20µl del ARN obtenido en el paso i), 6 µl de un tampón RT 5x (M-MLU® 200UI, Promega), 1,5µl de una mezcla que contenía en igual proporción cada uno de los 4 deoxinucleótidos (d-citosina, d-guanidina, d-timidina y d-adenosina) (Pharmacia Biotec), a una concentración de 10 mM de cada uno de ellos; 1µl del cebador inverso (Isogen) a una concentración de 1µg/µl. Esta mezcla se dejó 5 minutos a 65°C y luego 10 minutos a 42°C. A continuación se añadían 1µl de la enzima transcriptasa inversa (M-MLU® 200UI, Promega) y 0,25µl de un inhibidor de ARNasas (RNAsina® 30U/µl, Promega) y se incubaba 1:30 horas a 42°C.

iii) PCR. En un tubo se mezclaron 34µl de agua miliQ, 5µl del tampón de la enzima ADN-polimerasa 10x (Perkin Elmer), 3µl de MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 1µl de la mezcla de los 4 deoxinucleótidos 10mM (Pharmacia Biotec), 1µl del cebador inverso a una concentración de 100ng/µl y 5µl del cADN obtenido en el paso ii). La mezcla se incubaba en el termociclador durante 2 minutos a 94°C (desnaturalización del ADN) y luego se le añadían 0,3µl de la enzima ADN-plimerasa 5U/µl (AmpliTAQ® 250U, Perkin Elmer). El eppendorf se volvía a introducir en el termociclador con el siguiente programa secular:

1. 94°C durante 10 minutos
2. 35 ciclos, cada uno de ellos con 3 etapas:
  - . desnaturalización a 94°C durante 1 minuto
  - . anillamiento a 59°C por 1 minuto
  - . elongación a 72°C durante 1 minuto
3. 72°C durante 10 minutos
4. mantenimiento a 4°C

iv) Visualización del producto de PCR. Para ello se empleó la electroforesis de geles de agarosa y posterior observación bajo luz ultravioleta (Suarez *et al.*,1994).

### 3.3 Vacunas empleadas

Para estudiar la seguridad y eficacia de las vacunas presentes en el mercado español, se utilizaron dos vacunas conteniendo virus atenuado:

- *AmervacPRRS*<sup>®</sup> (Laboratorios Hipra, S.A.): elaborada con la cepa europea VSRRP-5710 a una concentración mayor o igual a  $10^5$  DI<sub>50</sub>CT. Esta cepa fue aislada en Gerona (España) en 1991 y atenuada por 18 pases sucesivos en un clon de la línea celular MA-104, recibiendo entonces el nombre de VP-046 BIS. La dosis recomendada por los fabricante es de 2ml aplicada por la vía intramuscular (IM).

- *Pyrsvac-183*<sup>®</sup> (Laboratorios Syva, S.A.): contiene la cepa europea del VSRRP All-183, a una concentración mínima de  $10^5$  DI<sub>50</sub>CT. La cepa se aisló en Murcia (España) en el año 1991 y posteriormente fue atenuada por 183 pases sucesivos en un cultivo celular adaptado de la línea Swine Testis (ST). La dosis indicada es de 2 ml IM.

Tanto la vacuna *AmervacPRRS*<sup>®</sup> como *Pyrsvac-183*<sup>®</sup> fueron tituladas en cultivos de MAP y en la línea celular MARC-145. Para ello se utilizaron frascos procedentes del mismo lote que posteriormente sería utilizado en los animales. Ambas vacunas se reconstituyeron en el momento de su aplicación siguiendo las instrucciones del fabricante.

Además cuando se comprobó la eficacia de las vacunas, se utilizó el inmunógeno inactivado *Cyblue*<sup>®</sup>, preparado a partir de una cepa del VSRRP aislada en España en el año 1991 y producida en MAP e inactivada con B-propiolactona a una concentración final del 2‰. Está formulada en adyuvante oleoso con un título mínimo de  $10^{5.5}$  DI<sub>50</sub>CT/por dosis. Los fabricantes recomiendan aplicar 2ml por animal, vía IM.

Las vacunas se inyectaron en los músculos del cuello utilizando una jeringa Muto de dosis múltiples y agujas de 30 x 1,2 mm.

### **3.4 Obtención, preparación y almacenamiento de muestras**

#### **3.4.1 Muestras de sangre**

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción yugular, utilizando el sistema de extracción Vacutainer® (Becton Dickinson) con tubos no siliconados y tubos con EDTA (para realizar los hemogramas), utilizando agujas de 1,2 x 38 mm para las cerdas y de 0,8 x 25 mm para los lechones.

Para la extracción del suero, la sangre recolectada en tubos no siliconados se dejó a temperatura ambiente hasta su coagulación; luego se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a 4°C. El suero se recogió asépticamente en tubos eppendorf estériles de 2ml, haciendo 4 alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Cuando se determinó la presencia del virus, las muestras se descongelaron a 37°C y se diluyeron 1:4 en DMEM suplementado con antibiótico, previo a la inoculación en cultivos celulares.

La sangre recogida en tubos con EDTA, se conservó en refrigeración hasta su pronta utilización para la determinación hematológica.

#### **3.4.2 Hisopos nasales**

Los hisopos nasales se recogieron mediante la introducción de escobillones estériles de 15 cm de longitud y realizando un raspado profundo en ambos orificios nasales. Posteriormente se sumergieron en tubos conteniendo 2 ml de DMEM. Las muestras se llevaron al laboratorio en condiciones de refrigeración, donde se mezclaron en un agitador (Vortex-Genie 2) y se recogieron con la ayuda de una aguja 20G x 1<sup>1/2</sup>" (Terumo) y una jeringa de 5 ml (Terumo) para pasarlas por un filtro de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro (Renner). El líquido así obtenido se recolectó en tubos eppendorf estériles y se almacenó a -80°C hasta su utilización. Para aislamiento del VSRRP se descongelaron a 37°C y se inocularon directamente en microplacas de cultivo sembradas con MAP.

#### **3.4.3 Heces**

Las heces se recogieron mediante extracción rectal de una muestra con la ayuda de un guante plástico. En el laboratorio, se realizaron diluciones 1:10 p/v (0,5 gr de heces en 4,5 ml de DMEM) que fueron colocadas en un tubo para facilitar su mezcla con la ayuda de un agitador (Vortex-Genie 2). Luego se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos a 4°C; el

sobrenadante se recogió con la ayuda de una aguja y jeringa y se pasó por un filtro de jeringa de 0,45 µm de diámetro de poro (Renner). El líquido se recogió en un tubo eppendorf de 2 ml y se guardó a -80°C para proceder al aislamiento de virus en cultivos de MAP, previa descongelación a 37 °C.

#### **3.4.4 Muestras recogidas a la necropsia**

Las diferentes muestras de órganos procedentes de las cerdas o de sus crías se trataron de igual forma.

Al momento de la necropsia, pequeños trozos de órganos (amígdalas, ganglios, riñón, bazo, corazón) se recogieron en bolsas de plástico con cierre, correctamente identificadas y se guardaron a -80° C hasta su procesamiento. Para ello, se las descongeló, y se las diluyó 1:10 p/v en DMEM, se trituraron mediante la ayuda de un masticador (Yull). A continuación, los macerados se centrifugaron a 1500 g durante 20 minutos a 4°C, para retirar los restos celulares. Los sobrenadantes así obtenidos se pasaron por filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro y se almacenaron a -80°C hasta su utilización para el aislamiento del VSRRP. Para ello se descongelaron a 37 ° C inmediatamente antes de ser inoculadas.

Si al realizar la necropsia de fetos y/o lechones, se observó que los líquidos pericárdico, torácico o abdominal poseían alteraciones en cantidad, color o consistencia, entonces se recogieron las alícuotas correspondiente. Se las clarificó a 1000 g durante 15 minutos y el sobrenadante se pasó a través de filtros de jeringa de 0,45 µm de diámetro de poro. Se almacenaron a -80°C y previo a su utilización para el aislamiento vírico, se diluyeron 1:4 en DMEM.

Cuando se practicó la necropsia a los lechones sacrificados a los 21 días de nacidos, se tomaron muestras de MAP. Para ello se extrajeron los pulmones y a través de la tráquea, con la ayuda de una jeringa de 50 ml se le introdujeron 100 ml de PBS suplementado con antibióticos. Se obliteró la tráquea en su porción superior con una pinza de Crile y se realizó unos masajes sobre la superficie del pulmón para facilitar el desprendimiento de las células. A continuación, el líquido se depositó en tubos de 50 ml (TTP) para ser sometidos a una centrifugación (1000 g durante 20 minutos a 4°C). El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 5 ml de DMEM. Para favorecer la rotura celular y permitir la liberación de los posibles virus, las células fueron sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación y a continuación se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de jeringa de 0,45 µm de diámetro



de poro. El líquido así recuperado se almacenó a -80° C hasta su utilización para el aislamiento vírico.

### **3.5 Análisis serológicos**

#### **3.5.1 Seroneutralización vírica (SN)**

La técnica se llevó a cabo en células de la línea MARC-145 según el método descrito por Yoon *et al.* (1994).

Los sueros a analizar se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y se realizaron diluciones en base 2 (desde la dilución 1:2 hasta la 1:2048) en microplacas de 96 pocillos, utilizando EMEM con 3% de SFB a un volumen de 50 µl/dilución. Seguidamente, se le agregó 50 µl del VSRRP cepa 5710, conteniendo 200 DI<sub>50</sub>CT, preparado en EMEM suplementado con 20% de suero porcino fresco. Tras una suave agitación, las placas se incubaron en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora, para permitir la unión antígeno-anticuerpo. Pasado este período se dispensó 100 µl de suspensión de células en EMEM con 3% de SFB, a una concentración de entre 2-3 x 10<sup>6</sup> células/ml. Todas las muestras de sueros se colocaron por duplicado.

A cada suero se le realizó un control de citotoxicidad, consistente en 50 µl de suero puro, más 50 µl de EMEM con 3% de SFB y 100 µl de células. Además cada placa llevó controles de células, para lo cual se colocaron 100 µl de EMEM con 3% de SFB y 100 µl de la suspensión celular.

En cada lote de placas se incluyó un suero positivo de un animal experimentalmente infectado con título de anticuerpos neutralizantes (AcNt.) de 1:64 y un suero perteneciente a un animal negativo a la infección por el VSRRP, en las mismas diluciones que los sueros problema. Además se realizaron controles de las dosis infectivas usadas, para lo cual se inocularon pocillos con 200, 20 y 2 DI<sub>50</sub>CT/50 µl .

Las placas se dejaron en incubación durante 6 días, al cabo de los cuales se realizó la lectura, observando la presencia o ausencia de ECP. El título se consideró como la mayor dilución capaz de inhibir totalmente el ECP del virus, en al menos uno de los dos pocillos.

La técnica se dio como válida cuando el título del virus se halló entre  $2 \times 10^{1.5}$  y  $2 \times 10^{2.5}$  DI<sub>50</sub>CT/50 µl. Asimismo, no debía detectarse ECP en los pocillos control de células y el suero control positivo debía presentar un título similar en  $\pm 1$  dilución del previamente determinado.

El suero porcino fresco se obtuvo a partir de lechones de entre 21-45 días de vida, procedentes de una granja libre de PRRS, testados por seroneutralización, Elisa y aislamiento viral. Para ello se extrajo sangre de la vena jugular utilizando tubos Vacutainer® (Becton-Dickinson) y agujas de 0,8 x 25 mm. Se permitió que la sangre coagulara a temperatura ambiente durante 15-30 minutos y se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a 4°C. El suero así obtenido se distribuyó en tubos de 5 y 10 ml y se almacenó a -80°C.

### **3.5.2 Técnica de ELISA**

Para la determinación de anticuerpos por la técnica de ELISA se empleó un producto comercial llamado IngezimPRRS® (Ingensa, S.A.). El ELISA es del tipo indirecto, y posee una proteína vírica recombinante, producto de la ORF-7, expresada en el sistema de baculovirus, como antígeno adherido a la placa, utilizando como conjugado un anticuerpo monoclonal frente a la nucleocápside vírica.

En la titulación de los sueros, se realizaron cuatro diluciones de base dos, partiendo de la dilución 1:200 (según las recomendaciones del fabricante). En aquellos casos en que solo se determinó la presencia o ausencia de anticuerpos contra el VSRRP, se utilizó la dilución 1:200 (de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

La lectura se realizó mediante un espectrofotómetro para placas de ELISA Reader Microelisa system® (Organon Teknika) con un filtro de 410 nm.

### **3.6 Análisis hematológicos (Hemograma)**

Los recuentos de células blancas se realizaron en un analizador hematológico cuantitativo, semiautomatizado (Coulter Counter CBC 5).

Para ello y siguiendo las instrucciones del fabricante, las muestras se diluyeron 1:500 en el reactivo lítico ZAP-OGLOBIN®II, que permitía la estromalización de los eritrocitos, liberando la hemoglobina y quedando reducidas las partículas celulares a un tamaño que no interfería con el recuento de los glóbulos blancos.

### 3.7 Diseño experimental para estudiar la seguridad de las cepas vacunales

#### 3.7.1 Animales empleados y mantenimiento de los mismos

Para realizar este trabajo se utilizaron 16 cerdas nulíparas cruce de Landrace x Large White, seronegativas al VSRRP mediante las técnicas de ELISA indirecto y seroneutralización viral. Los animales llegaron con 80 días de gestación, aproximadamente; se los separó por grupo de tratamiento y se los mantuvo en condiciones de aislamiento en establos con cama de paja. Diez días antes de la fecha prevista de parto, se colocaron en parideras individuales, donde permanecieron hasta el momento del destete.

Las cerdas se alimentaron con 2 - 3 kg de pienso de gestación (SRU-G, Proinserga), que contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles. Después del parto se les dio pienso *ad libitum*. Los lechones se alimentaron con leche materna exclusivamente.

#### 3.7.2 Tratamientos asignados e inoculación experimental

Las cerdas, a su llegada, se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 4 cerdas cada uno:

- **Grupo A**, numeradas del 1 al 4, actuaron como control y recibieron en el momento de la inoculación 8 ml del sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar.
- **Grupo B**, numeradas del 5 al 8, sirvieron como control infectado y recibieron  $10^6$  DI<sub>50</sub>CT de ocho cepas del VSRRP descritas en el apartado 3.2.1 (92VO58, 5710, VP035, A4, A5, NL3.1, NL4.2 y 2156), resuspendidas en 8 ml de DMEM
- **Grupo C**, numeradas del 9 al 12, se infectaron con  $10^6$  DI<sub>50</sub>CT en 8 ml de la cepa vacunal VP046 BIS.
- **Grupo D**, enumeradas del 13 al 16, recibieron  $10^6$  DI<sub>50</sub>CT en 8 ml de la cepa vacunal All-183.

Todas las inoculación se realizaron por la vía intranasal en el día 90 ( $\pm$  3 días) de gestación, con la ayuda de una cánula de polietileno adaptada a una jeringa de cono Luer.

Los animales se sacrificaron en un matadero de la zona en el día 49 ( $\pm$  3) p.i., mediante aturdimiento con una corriente eléctrica continua y sangrado a muerte.

### **3.7.3 Toma de muestras**

Diariamente se observó la ingesta de alimento y la posible presencia de signos clínicos en los animales. Además, se registraron las temperaturas rectales de todos los animales desde el día de su llegada hasta el día 10 p.i.

Las muestras de sangre sin anticoagulante, hisopos nasales y rectales se tomaron en el momento previo a la inoculación experimental (d 0) y en los días p.i. 3; 5; 9; 12; 21; 28; 35; 42 y 49. A partir de estas muestras se intentó el aislamiento del virus en cultivos de MAP y en células de la línea MARC-145 (según lo especificado en el apartado 3.2.3). Además en los días 0; 3; 5; 9; 12 y 21 se recogieron muestras de sangre en tubos con EDTA, para las determinaciones hematológicas (apartado 3.6).

Al sacrificio de los animales se tomaron muestras del pulmón, amígdalas, GLSM., corazón, riñón y bazo, las que se procesaron como se describe en el apartado 3.2.4 para intentar el aislamiento del VSRRP, en cultivo de MAP

### **3.7.4 Evaluación clínica de las hembras.**

En el período previo y posterior a la aplicación de la vacuna y de la inoculación experimental, las hembras fueron sometidas a un seguimiento clínico a fin de poder detectar cualquier manifestación relacionada al VSRRP.

Los parámetros considerados (apartado 3.7.3) fueron evaluados por categorías a fin de poder realizar una comparación entre grupos (tabla 2).

*Tabla 2. Puntuación de los parámetros clínicos evaluados en las hembras del estudio.*

<b>Signos clínicos</b>	<b>Puntuación</b>
Aspecto general	
normal	0
anorexia	0,05
letargia	0,1
Sistema respiratorio	
respiración superficial	0,05
respiración rápida	0,1
respiración trabajosa	0,2
Descarga nasal	
normal	0
aumentada	0,05
Lesiones en piel	
coloración en piel	0,05

La puntuación final se obtiene sumando los valores ponderados de cada signo por el número de días que estuvo presente.

### **3.7.5 Manejo del parto**

Entre 7 y 10 días antes de la fecha teórica del parto ( $114 \pm 3$  días) y coincidiendo con el traslado de las cerdas a las jaulas de parto, se montó un sistema de vigilancia intensiva a los fines de presenciar y/o prestar asistencia en dicho momento, así como para recoger las muestras pertinentes.

Los lechones que nacían vivos se secaron con viruta de madera y se les desinfectó el cordón umbilical mediante un algodón embebido en yodopovidona. A continuación se pesaron en una báscula electrónica y se identificaron a través de un crotal plástico numerado colocado en el pabellón auricular.

Los lechones nacidos muertos se colocaron en bolsas individuales, debidamente identificadas, que se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento una vez finalizado el parto.

### 3.7.6 Manejo y toma de muestras a partir de los lechones

Los lechones nacidos muertos mantenidos en refrigeración se llevaron al laboratorio, donde se estimó la edad de muerte fetal midiendo la distancia existente entre la base de la nuca hasta el origen del rabo (Straw *et al.*, 1999). En función de ella y de su aspecto se los clasificó en tres categorías:

- *Fetos momificados tipo I*: longitud menor de 21 cm, totalmente deshidratados. Se consideró que la muerte fetal aconteció previa a la infección con el VSRRP.

- *Fetos momificados tipo II*: fetos que murieron posterior al día 90 de gestación (longitud superior a los 21 cm), que presentaron un estado de descomposición incipiente, con coloración amarronada y muy edematosos. A la necropsia, frecuentemente exhibían abundante líquido sanguinolento en cavidad abdominal y/o torácica.

- *Nacido muerto de aspecto normal*: fetos con tamaño superior a los 21 cm de longitud, de aspecto normal, cuya muerte se produjo cerca de la fecha de parto.

Una vez clasificados, se procedió a realizar la necropsia, tomando muestras de pulmón, corazón, bazo, riñón, amígdalas, ganglios linfáticos submandibulares (GLSM.), retrofaringeos (GLRF.) e inguinales superficiales (GLI.), así como de líquido torácico o abdominal, en los casos que presentaron alteraciones tanto en la cantidad como en su aspecto. En aquellas situaciones donde los fetos eran de tamaño muy pequeño, los ganglios se almacenaron y procesaron de forma conjunta ("pool"). Estas muestras se trataron como se detalla en el inciso 3.4.4 para luego intentar el aislamiento del virus en cultivos de MAP (3.2.3).

Los lechones nacidos vivos se sangraron (apartado 3.4.1) previo a la ingesta de calostro (muestra del día 0) y en los días de vida 4; 8; 15 y 21, para intentar aislamiento vírico en cultivos de MAP (3.2.3). Con el suero obtenido en los días 0 y 21 se determinó la presencia de anticuerpos mediante el ensayo de ELISA (3.5.2) y se realizó SN para determinar el título de anticuerpos neutralizantes (3.5.1).

Cada cerda y su camada se observaron al menos dos veces al día, a los fines de identificar manifestaciones clínicas, registrar muertes o cualquier otro acontecimiento. En las bajas producidas durante la lactación, no solo se registró el día del acontecimiento, sino también la posible/s causas de muerte. En estos lechones se practicó inmediatamente la necropsia y se recogieron además de las muestras enumeradas anteriormente, muestras de

MAP. Estas muestras se procesaron según lo descrito en el inciso 3.4.4 para luego proceder al aislamiento del VSRRP en MAP.

A los 21 días de vida, los lechones se sacrificaron, mediante sangría a muerte, previa administración intramuscular de 0,1g de azaperona (Stresnil<sup>®</sup>, Laboratorios Esteve); se los pesó utilizando una báscula electrónica y se realizó la necropsia, recogiendo las mismas muestras que en el caso anterior.

### **3.7.7 Registro de datos productivos**

De cada cerda se registraron los siguientes datos productivos:

Σ Al parto:

- . Total de nacidos por camada
- . Total de nacidos muertos (NM)
  - Fetos momificados tipo I
  - Fetos momificados tipo II
  - Nacidos muertos normales
- . Total de nacidos vivos (NV)
  - Nacidos vivos < 0,9 kg (nacido débil)
  - Nacidos vivos > 0,9 kg

Viabilidad al nacimiento: nº de lechones vivos / nº total de lechones nacidos

Σ Datos productivos al destete:

- . Total de muertos durante la lactación
- . Causas de muerte durante la lactancia
- . Destetados/cerda
- . Viabilidad al destete: nº de lechones destetados / nº de lechones nacidos totales
- . Peso al destete

### **3.7.8 Análisis estadísticos**

Para realizar la comparación entre los resultados en cada grupo en las mediciones de temperatura rectal, leucocitos, linfocitos y neutrófilos, los valores fueron sometidos a un análisis de varianza de medidas repetidas bifactorial (tiempo y grupo), así como a un análisis

de varianza de medidas repetidas unifactorial para establecer el efecto grupo y tiempo por separado.

Los distintos datos productivos fueron comparados entre los grupos aplicando un análisis de varianza, junto a la prueba de rangos múltiples de Duncan, a fin de establecer las distintas categorías en los casos que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa de ordenador SAS® Software.

### **3.8 Diseño experimental para estudiar la eficacia de las vacunas contra el VSRRP.**

#### **3.8.1 Animales utilizados y mantenimiento de los mismos**

Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron 28 cerdas nulíparas cruce de Landrace x Large White, con 180-190 días de vida, seronegativas al VSRRP mediante las técnicas de ELISA indirecto y seroneutralización vírica. Antes del inicio de la prueba, las cerdas se mantuvieron durante un mes -aproximadamente- en grupos de 4 ó 5, en establos con cama de paja. Diez días antes de la fecha de vacunación se establecieron los grupos de trabajo (ver inciso 3.7.3) y cada uno de ellos se ubicó en boxes aislados. Entre 7 y diez días previos a la fecha prevista de parto, las cerdas se alojaron individualmente en jaulas de parto hasta el momento del sacrificio.

Para la detección de celos se utilizaron tres verracos cruce Landrace x Large White seronegativos al VSRRP, por ELISA y por SN. Estos animales tenían alrededor de 10 meses de edad y se mantuvieron en condiciones de aislamiento.

Todos los animales se alimentaron con 2 kg/día de pienso SRU-G (Proinserga), que contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles. Después del parto, las hembras recibieron pienso "ad libitum", y los lechones fueron alimentados exclusivamente con leche materna.



### **3.8.2 Sincronización de celos e inseminación artificial**

Para estimular la llegada de la pubertad y detectar la salida a celo de las cerdas, se expusieron diariamente en grupos de 3 a 5, a la presencia de uno de los verracos, durante unos 15 minutos por la mañana y otros 15 minutos por la tarde.

La sincronización de los celos y la inseminación artificial se llevó a cabo cuando todas las cerdas habían presentado, al menos una vez, manifestaciones externas de celo. Para ello se administraron, por vía oral, 20 mg/cerda/día de altrenogest (Regumate®, Hoechst-Roussel Veterinaria) durante 18 días, siguiendo las instrucciones del fabricante. A las 24 horas de terminado el tratamiento con el progestágeno, se inyectaron, por la vía IM, 800 UI de PMSG (Serigan®, Laboratorios Ovejero) y a las 72 horas 400 UI de HCG (Coriogon®, Laboratorios Ovejero). Seguidamente y para facilitar la detección de los celos, las cerdas se expusieron a la presencia del macho, por la mañana y por la tarde. Todas las cerdas que mostraron signos externos de celo entre las 24-72 horas de la aplicación de la HCG se inseminaron 3 veces, con un intervalo de 12 horas entre cada una, empezando en el momento que se detectó el celo. El segundo día de celo se consideró día 0 de gestación.

Para la inseminación artificial se utilizaron dosis de semen refrigerado procedente de verracos seronegativos al VSRRP. Para la preparación de las dosis, el semen se recogió mediante el método manual. Posteriormente se contrastó su calidad determinando motilidad, formas anormales y concentración espermática. Cada dosis contenía  $4 \times 10^9$  espermatozoides en un volumen total de 100 ml de MRA® (Kubus, S.A.) preparado según las indicaciones del fabricante. La mezcla se homogeneizó a 37°C en los frascos utilizados para realizar la inseminación artificial. Las dosis se mantuvieron durante 3 horas a temperatura ambiente, y luego se conservaron en estufa a 15°C hasta el momento de su utilización. Entonces se calentaron a 35°C en baño maría durante 10 minutos. Posteriormente, se observó la motilidad espermática, y en el caso que fuese satisfactoria, se procedió a la inseminación de las cerdas depositando una dosis en el útero a través de un catéter de inseminación fijado al cuello uterino. Nunca se utilizaron dosis cuyo tiempo de preparación hubiera superado las 36 horas.

### **3.8.3 Asignación de grupos y tratamientos**

Las cerdas se dividieron aleatoriamente en 5 grupos:

- **Grupo A**, formado por 4 cerdas -numeradas del 1 al 4- que sirvieron como control no vacunadas ni infectadas.

- **Grupo B**, constituido por 5 cerdas, numeradas del 5 al 9, que permanecieron como control de la infección, no se las vacunó pero recibieron la dosis de virus desafío.

- **Grupo C**, conformado por 7 cerdas, numeradas del 10 al 16, que fueron vacunadas con una dosis de la vacuna *AmervacPRRS*<sup>®</sup>, vía IM, en el día de inicio de la sincronización de celo.

- **Grupo D**, establecido por 7 cerdas, numeradas del 17 al 23, las que recibieron, al inicio de la sincronización de celos, una dosis de 2ml, colocada IM, de la vacuna *Pyrsvac-183*<sup>®</sup>.

- **Grupo E**, formado por 5 cerdas, numeradas del 24 al 28. Recibieron dos dosis de la vacuna. *Cyblue*<sup>®</sup>, una al inicio de la sincronización de celos y la otra 21 días después.

Las cerdas de los grupos B, C, D y E en el día 90 de gestación fueron inoculadas por la vía intranasal con 16 ml (8 por cada orificio) de un lote del VSRRP compuesto por 8 cepas europeas (92VO58, 5710, VP035, A4, A5, NL3.1, NL4.2 y 2156), descritas en el apartado 3.2.1.

Para la preparación del inoculo, de cada cepa de virus se cogieron 2 ml de la dilución que contenía  $10^5$  DI<sub>50</sub>CT /ml, inoculando un total de  $1,6 \times 10^6$  DI<sub>50</sub>CT. Las cerdas del grupo A recibieron 16 ml del sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar con el virus, vía intranasal.

Las inoculaciones se realizaron introduciendo el líquido por cada una de las fosas nasales en el momento de la inspiración, mediante una cánula de polietileno adaptada a una jeringa de 10 ml de cono Luer.

Los animales se sacrificaron en matadero, en el día  $49 \pm 2$  p.i., mediante aturdimiento con una corriente eléctrica continua y sangría a muerte.

#### **3.8.4 Diseño experimental**

Para estudio de la eficacia de las vacunas contra el VSRRP se siguieron diferentes pautas de manejo y toma de muestras a lo largo del período experimental (figura 1):

- *Día -10 a -1*: en el día -10 las cerdas se distribuyeron según lo expuesto en el inciso de "Asignación de grupos y tratamientos" (3.8.3). Durante este período se tomó la temperatura rectal a cada cerda, al menos una vez al día. Asimismo se registró la ingesta de pienso.

- *Día 0*: coincidente con el inicio de la sincronización de celos (3.8.2). Cada grupo recibió el tratamiento asignado (apartado 3.8.3) .

- *Del día 1 al día 21 post vacuna (p.v.)*: de cada cerda se registró diariamente, la temperatura rectal (hasta el día 15 p.v.) y el consumo de alimento. Además se observó la posible presencia de reacciones locales o generales que pudieran haber sido atribuidas a la inoculación de la vacuna y/o el placebo. Antes de la vacunación (día 0) y en los días 3; 5; 7; 12; 15 y 21 p.v. se tomaron muestras de sangre en tubos con y sin EDTA (3.4.1), muestras de secreciones nasales (3.4.2) y de heces (3.4.3), en los animales de los grupos B, C y D.

A partir del suero obtenido de la sangre sin anticoagulantes se realizaron las siguientes determinaciones:

\* aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP (3.2.3) y en la línea celular MARC-145 (3.2.3). Las muestras positivas se titularon de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.2.2.

\* titulación de anticuerpos contra el VSRRP mediante las técnicas de SN (3.5.1) y de ELISA (3.5.2).

Los hisopos obtenidos de cavidad nasal y las muestras de heces, previa preparación (3.4.2 y 3.4.3) se inocularon en cultivos de MAP para intentar el aislamiento del virus (3.2.3).

A partir de la sangre recogida en tubos con EDTA se realizaron las determinaciones hematológicas en los grupos B, C y D.

- *Día 42 al 104 p.v (día 14 al 84 de gestación, respectivamente)* : las cerdas de los grupos C, D y E se sangraron cada 14 días (día 42; 56; 70; 84; 90 y 104 p.v.). A partir del suero (3.4.1) se determinó el título de anticuerpos neutralizantes (3.5.1) y de aquellos detectados por el ensayo de ELISA (3.5.2).

- *Día 90 de gestación ( día 118 p.v.)*: se realizó la inoculación experimental con virus virulento (descrito en el punto 3.7.3). Se consideró como día +0.

- *Día +0 a +21 post inoculación (p.i.):* De cada una de las cerdas de los 5 grupos se recogieron a diario, los siguientes datos:

- \* presencia de reacciones locales o generales compatibles con la infección por el VSRRP.

- \* consumo de alimento

- \* temperatura rectal (desde diez días previos a la inoculación hasta 15 días después).

Antes de la inoculación experimental (día +0) y en los días +3; +5; +9; +12; +15 y +21 p.i. se recogieron muestras de sangre en tubos con y sin EDTA (3.4.1), muestras de secreciones nasales (3.4.2) y de heces (3.4.3).

A partir de las muestras de suero se realizó:

- \* aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP (3.2.3). Las muestras positivas se titularon de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.2.2.

- \* titulación de anticuerpos contra el VSRRP mediante SN (3.5.1) y ELISA (3.5.2).

Los hisopos obtenidos de cavidad nasal y las muestras de heces, previa preparación (3.4.2 y 3.4.3) se inocularon en cultivos de MAP para intentar el aislamiento del virus.

A partir de la sangre recogida en tubos con EDTA se realizaron las determinaciones hematológicas .

- *Día +28 al +49 p.i.:* se tomaron muestras de sangre cada 14 días +28, +35, +42 y +49. A partir del suero (3.4.1) se realizaron las técnicas de SN (3.5.1) y ELISA (3.5.2).

En el día + 49 ( $\pm$  2 días) se llevó a cabo el destete de los lechones y el posterior sacrificio de las hembras (3.7.3). A la necropsia, se recogieron muestras de amígdalas, GLSM., pulmón, corazón, bazo y riñón, las que se procesaron como se menciona en el punto 3.4.4 y se inocularon en cultivos de MAP para aislar el VSRRP.

El seguimiento clínico de las cerdas se realizó siguiendo lo descrito en el apartado 3.7.4 "Evaluación clínica de las hembras".

En el momento del parto se procedió de igual forma que la descrita en el objetivo A (apartado 3.7.5).

Los cerdos nacidos muertos se clasificaron según lo expuesto en el apartado 3.7.6, siguiendo la misma pauta de manejo y toma de muestra allí descrita.

De cada cerda se contabilizaron los datos productivos al parto y al destete (3.7.7).

### **3.8.5 Análisis estadístico**

El análisis estadístico aplicado fue el mismo que el descrito en el Objetivo A (apartado 3.7.8).

Los resultados obtenidos en las mediciones de anticuerpos fueron comparados mediante el análisis de Kruskal-Wallis junto a la prueba de comparaciones múltiples no paramétrica, a fin de poder establecer rangos.

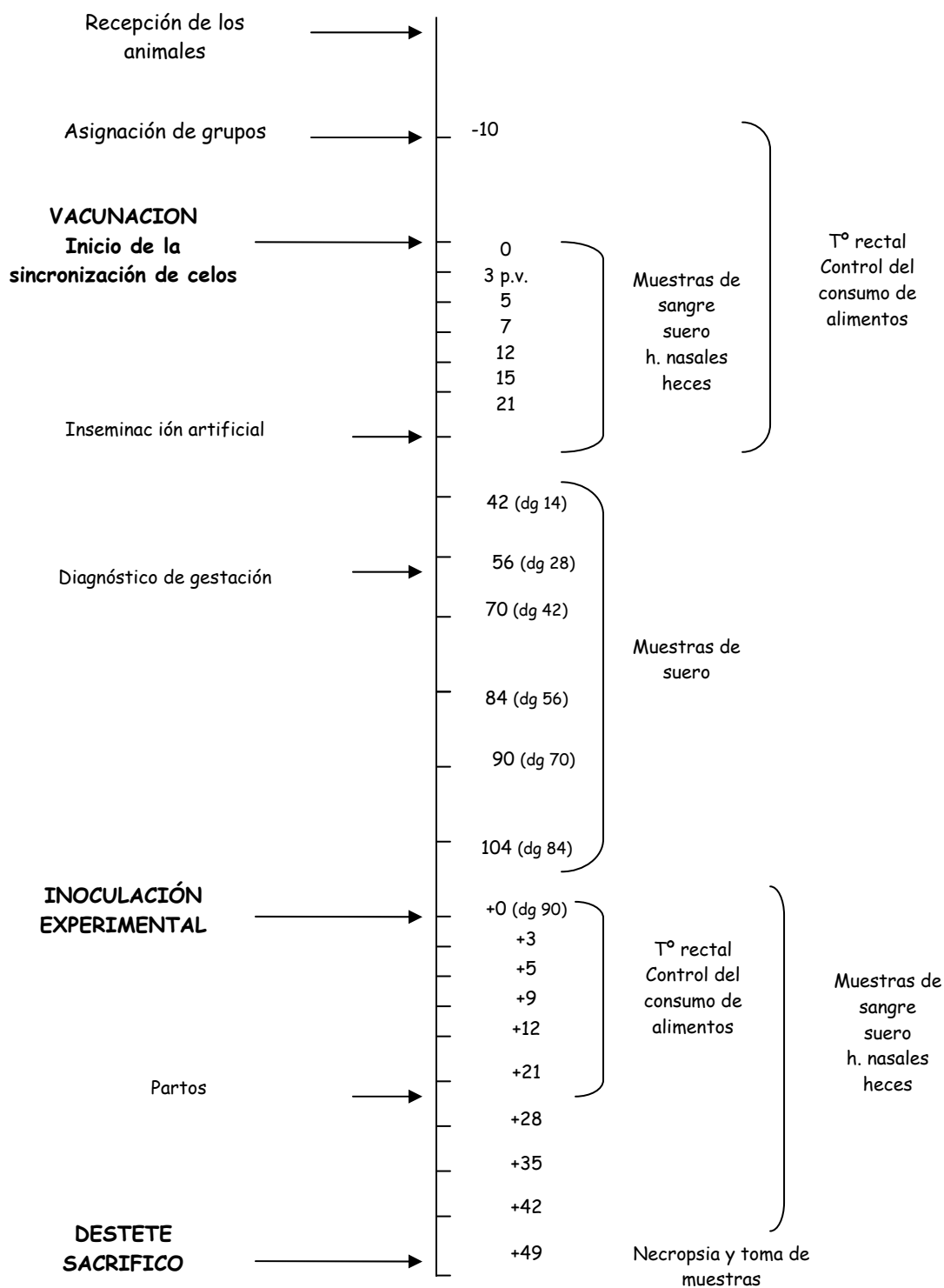


Figura 1. Esquema del diseño general utilizando para evaluar la eficacia de las vacunas contra el VSRRP en cerdas gestantes.

## **VI. Resultados y Discusión**

#### 4.1. Seguridad en cerdas gestantes de las cepas VP046 BIS y ALL-183 del VSRRP.



#### **4.1.1 Resultados**

##### **4.1.1.1 Signos clínicos**

En los grupos A, C y D los animales no mostraron ningún signo de enfermedad, permaneciendo normales durante todo el estudio. Sin embargo, en el grupo B (control infectado), se observó letargia en la cerda número 6 entre los días 4 y 8 p.i., así como trastornos del apetito en las hembras número 7 y 8. En la primera de ellas, consistió en una disminución del apetito durante el día 4 p.i., mientras que la cerda número 8 presentó anorexia en los días 1 y 2 p.i. De esta forma, la puntuación clínica adjudicada a los animales número 6; 7 y 8 fue de 0,5; 0,05 y 0,1, respectivamente. La cerda número 6 no mostró signos de enfermedad.

El análisis de la temperatura rectal se llevó a cabo considerando las 10 muestras obtenidas antes de la inoculación experimental como valor de referencia y las temperaturas anotadas después de la inoculación se dividieron en dos períodos: i) día 1 a 5 p.i. y ii) día 6 a 10 p.i. Los valores medios obtenidos de esta forma en los distintos grupos están representados en la figura 2, en tanto que en la tabla 3 se pueden observar las mediciones individuales de la temperatura rectal en cada hembra.

Las temperaturas rectales en los animales de los grupos A, C y D no alcanzaron niveles febriles. Sin embargo, las temperaturas promedio de todos los individuos del grupo B sufrió, entre los días 1 y 5 p.i., un incremento de 0,3°C respecto de la temperatura media de dicho grupo en el momento previo (días -10 a 0). Estos valores medios no son estadísticamente diferentes.

Por el contrario las cerdas del grupo B (control infectado), experimentaron una elevación de la temperatura tras la inoculación con el VSRRP, en los días 2 y 3 p.i., fundamentalmente. Si bien dicho aumento se registró en todos los animales del grupo, solamente en las cerdas número 6 y 8 la temperatura rectal fue superior a 39,7°C, llegando a alcanzar en la cerda número 6 los 40,6°C, en el día 2 p.i.. Los valores medios de este grupo en los días 1 a 5 p.i. presentan diferencias estadísticas con respecto a la media de los días previos ( $p < 0,05$ ).

Tabla 3. Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos A, B, C y D, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Grupo	Nº de cerda	D'as pre-inoculación							D'as post-inoculación									
		-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1	37,4	37,3	37,5	37,6	37,9	37,3	37,4	37,8	37,0	37,2	37,3	37,3	37,6	37,6	37,5	37,3	37,7
A	2	38,0	38,3	38,4	37,9	37,8	38,0	37,9	38,0	37,5	38,2	37,8	37,9	37,9	38,0	38,1	37,3	37,5
A	3	38,6	38,5	38,4	38,2	38,5	38,8	37,8	38,1	38,7	38,4	38,5	37,9	38,2	38,1	38,0	38,4	38,5
A	4	38,2	38,0	37,5	38,2	38,3	38,2	38,7	38,2	37,8	37,7	38,0	38,2	38,3	37,9	38,0	38,1	38,0
B	5	37,8	37,4	37,9	38,0	38,0	38,3	38,2	38,0	39,6	38,2	38,9	38,2	38,1	37,3	38,2	37,8	38,1
B	6	37,3	37,7	37,7	38,2	38,0	37,3	37,5	37,6	40,6	40,5	38,4	38,2	38,0	37,6	38,3	38,0	38,0
B	7	37,5	37,6	37,5	37,7	37,8	37,4	37,5	37,2	38,9	37,9	37,3	37,9	38,4	37,9	37,5	37,9	38,0
B	8	37,9	38,0	37,8	38,1	38,2	38,0	37,8	38,4	40,5	38,1	38,6	38,2	37,6	37,8	38,1	38,1	38,6
C	9	38,3	38,2	38,0	37,7	37,9	37,2	38,0	37,7	37,9	38,9	38,6	37,5	37,8	37,9	37,5	37,7	37,6
C	10	37,8	37,9	37,7	37,9	38,4	38,0	37,6	37,9	38,0	38,0	37,9	38,6	38,0	38,0	37,9	37,8	38,0
C	11	38,0	38,2	38,2	37,9	37,7	37,9	38,0	38,2	37,9	38,0	38,2	38,3	38,0	38,0	38,5	38,0	38,2
C	12	37,9	38,0	37,9	37,5	37,5	37,6	37,6	38,3	38,2	38,4	38,7	38,7	38,1	38,0	38,1	38,0	38,0
D	13	38,0	37,9	37,8	38,0	38,1	38,2	38,0	37,8	38,0	38,0	38,3	38,3	38,2	38,1	37,8	38,0	38,1
D	14	38,0	37,9	38,2	38,2	37,8	38,0	37,9	37,8	37,7	38,1	38,3	37,9	38,0	38,2	37,6	37,7	37,9
D	15	38,1	38,3	38,0	38,3	38,1	38,1	38,1	38,3	37,8	38,1	38,3	38,2	38,2	38,2	37,6	37,7	37,9
D	16	38,1	38,2	38,1	38,4	38,1	38,1	38,2	38,2	38,1	37,3	38,6	37,6	38,0	38,0	37,6	38,0	38,1

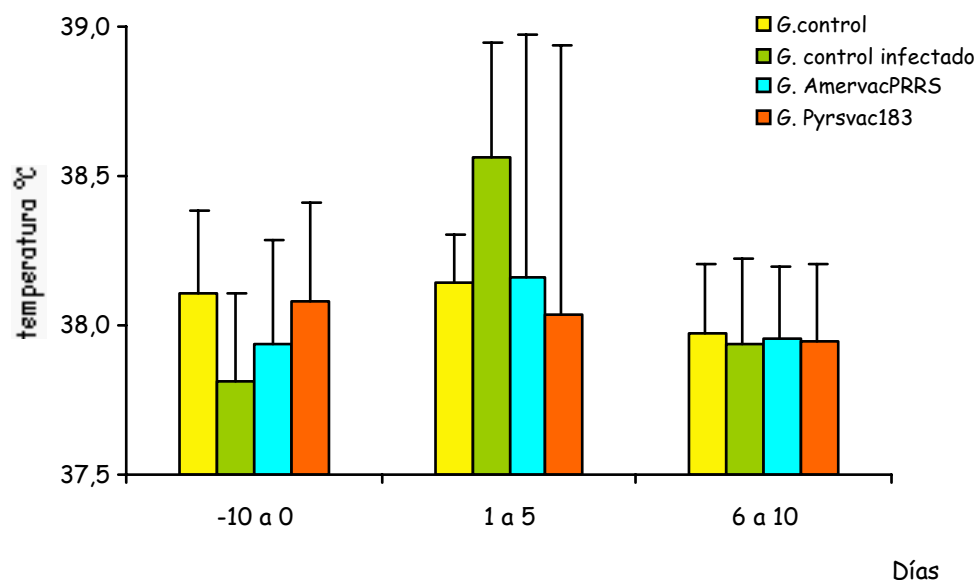


Figura 2. Evolución de de la temperatura rectal media de los distintos grupos en el momento previo a la inoculación con el VSRRP(días -10 a 0),y en dos momentos posteriores (del 1 al 5 y del 6 al 10,p.i.). Las barras representan una desviación estandar. En el grupo B la temperatura media de los días 1-5 difirió estadísticamente del momento previo (días -10 a 0) ( $p < 0,05$ ).

El número de células blancas en sangre periférica de los animales del grupo control (A) osciló dentro de los valores considerados normales, de 11.000 a 22.000 células/ml (Merck Manual, 6<sup>th</sup> Ed., p.906, Table 4). En la figura 3 se muestran los valores medios obtenidos en cada grupo en los diferentes momentos estudiados. En el grupo B, los valores medios de leucocitos disminuyeron un 20% y un 31% en los días 3 y 5 p.i., respectivamente. No obstante, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio del día 0 en relación a cada momento posterior ( $p > 0,05$ ). La baja más acusada ocurrió en el día 5 p.i., debido a que todos los animales presentaron recuentos inferiores a los normales, llegando a ser casi un 50% inferiores a los del día 0, en las hembras número 7 y 8. En el día 12 p.i. se produjo otra disminución del valor medio de leucocitos, induciendo leucopenia en dos individuos. En el grupo C (Amervac-PRRS®), también se produjo una reducción en el número medio de células blancas, aunque no alcanzó igual magnitud que en grupo anterior ( $p > 0,05$ ). Solamente la cerda número 10 en el día 5 p.i., presentó una leve leucopenia (10.500 cél/ml).

Respecto al grupo D (Pyrsvac-183<sup>®</sup>), presentó un comportamiento similar al anterior, si bien en el día 5 p.i., los valores tienden a recuperar el nivel inicial. No se marcaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios en los distintos momentos del estudio ( $p > 0,05$ ). En este grupo, las hembras número 13 y 16 mostraron, en los días 3 y 5 p.i., recuentos de glóbulos blancos por debajo del límite normal.

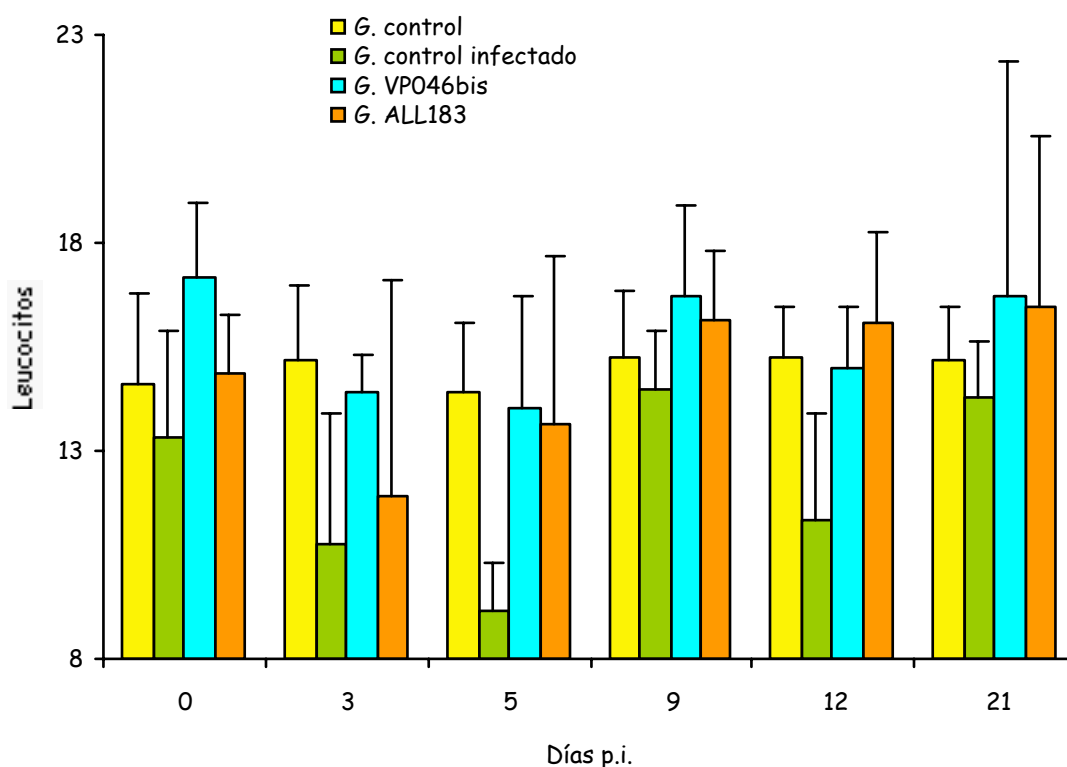


Figura 3. Valores medios de leucocitos por grupo y día de toma de muestra. Las barras representan una desviación estandar. Los valores p.i. obtenidos en cada grupo no difieren estadísticamente del día 0 ( $p < 0,05$ ).

Los porcentajes medios de linfocitos en los distintos grupos tendieron a evolucionar de una forma similar a través del tiempo ( $p > 0,05$ ) (figura 4). Paralelamente, en ningún grupo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes medios del día 0 respecto al resto de los días de muestreo ( $p > 0,05$ ).

Los neutrófilos se comportaron de una forma similar a los linfocitos, no mostrando interacción entre los distintos grupos ( $p > 0,05$ ), y dentro de cada grupo, los valores promedios obtenidos en cada momento fueron estadísticamente iguales ( $p > 0,05$ ) (figura 4).

En la tabla 4 están los valores de leucocitos, linfocitos y neutrófilos de todos los individuos analizados.

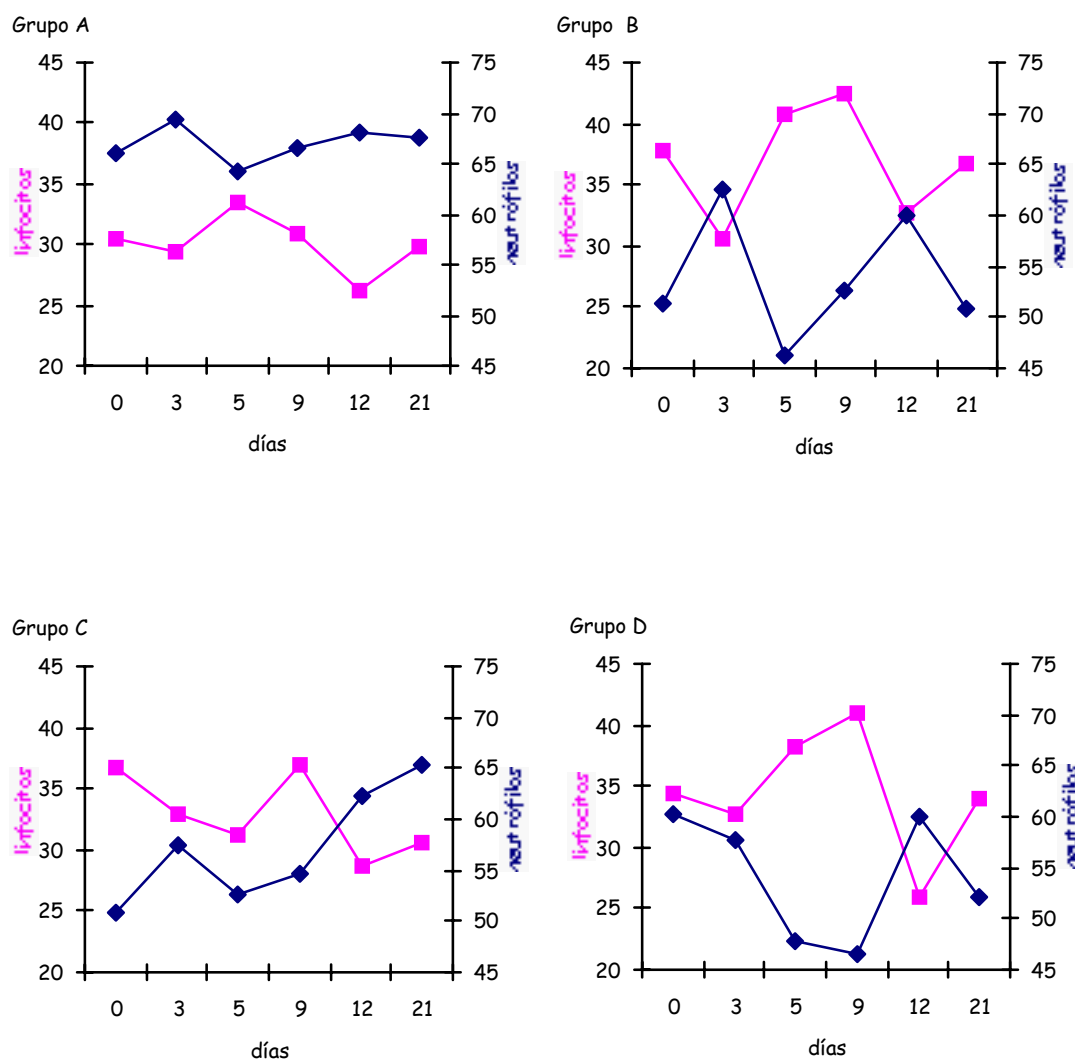


Figura 4. Evolución del porcentaje medio de linfocitos y neutrófilos en los grupos estudiados antes y después de la inoculación con el VSRRP. No existen diferencias significativas entre las medias obtenidas en el día 0 con respecto a los momentos posteriores, en cada grupo ( $p > 0,05$ ).

Tabla 4. Valores individuales de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en los grupos A, B, C y D.

Grupo	Nº							Días de obtención de las muestras de												
		Cerdas	Leucocitos (x1000)						Linfocitos						Neutr—filos					
			0	3	5	9	12	21	0	3	5	9	12	21	0	3	5	9	12	21
A	1	17,0	16,5	15,9	16,8	16,0	15,9	24	28	30	25	14	27	72	71	67	70	73	69	
A	2	13,1	12,8	13,0	13,9	14,5	15,1	36	32	36	34	30	29	56	67	62	65	66	68	
A	3	12,4	14,7	12,9	13,8	14,0	13,5	30	28	35	34	32	30	68	71	62	63	64	69	
A	4	15,9	16,7	15,8	16,4	16,5	16,3	32	30	33	31	29	33	68	68	66	68	69	64	
B	5	12,6	13,6	9,6	16,5	8,0	15,5	28	25	32	47	28	28	59	71	56	45	68	53	
B	6	11,0	12,1	10,5	13,4	13,8	14,6	39	24	36	51	30	36	49	68	52	44	66	52	
B	7	14,6	6,3	7,8	14,0	10,9	12,3	44	28	48	32	39	43	47	66	40	63	41	45	
B	8	16,0	11,0	8,8	14,0	12,7	14,6	40	45	47	40	34	40	50	45	37	59	65	53	
C	9	17,9	15,2	14,0	18,1	13,8	14,2	39	28	24	13	32	30	56	64	66	83	63	58	
C	10	19,0	14,4	10,5	15,0	16,9	12,6	52	24	36	28	20	30	44	68	45	56	79	67	
C	11	14,7	13,2	14,7	14,7	15,4	15,2	32	33	29	64	39	32	44	49	63	28	51	60	
C	12	17,0	14,9	17,0	19,0	13,8	25,0	24	47	36	43	24		59	49	37	52	56	76	
D	13	16,7	5,2	10,4	18,0	13,1	14,0	36	13	49	25	32	36	56	72	50	69	64	52	
D	14	14,9	16,5	17,2	17,0	18,4	22,1	35	39	47	47	28	40	57	52	44	49	52	48	
D	15	14,5	15,4	17,1	14,5	16,7	16,8	32	39	33	36	20	32	64	55	33	36	60	44	
D	16	13,3	10,5	9,8	15,0	16,0	13,0	35	40	24	56	24	28	64	52	64	32	64	64	

#### 4.1.1.2 Parámetros reproductivos y de producción

Los datos de producción de cada cerda y los valores medios por grupo, se indican en la tabla 5 y 6, respectivamente. Los partos de las cerdas sucedieron dentro de los límites considerados normales ( $114 \pm 3$  días), a excepción de las cerdas número 7 en el grupo B y número 12 del grupo C, que fueron en los días 120 y 110 de gestación, respectivamente. Todas las hembras presentaron partos eutósicos.

El tamaño de la camada estuvo comprendido entre 7 y 15 lechones, con una media de 9,75, 11,5; 10,25 y 11 lechones para los grupos A, B, C y D, respectivamente ( $p > 0,05$ ).

En los grupos A y D (control no infectado y cepa ALL-183, respectivamente) todos los lechones nacieron vivos. Mientras que en el grupo control infectado (B), hubo un 15,2% de lechones nacidos muertos, afectando a 3 camadas. Se observaron dos momias de tipo II, pertenecientes a las hembras número 7 y 8. En el grupo C (VP-046BIS), hubo un 9,3% de mortalidad al nacimiento, atribuido a 4 lechones nacidos muertos normales de la hembra número 12. En ningún caso se observaron fetos momificados tipo I. En la figura 5 se puede apreciar el aspecto que presentaron algunas de las camadas afectadas por el VSRRP, con fetos momificados tipo I, tipo II y lechones nacidos muertos de aspecto normal. El aspecto característico de los fetos momificados tipo II se muestra en la figura 6. En ella se puede observar la coloración amarronada y el abundante líquido en cavidad torácica y abdominal que fue observado en la mayoría de las necropsias realizadas en estos animales.

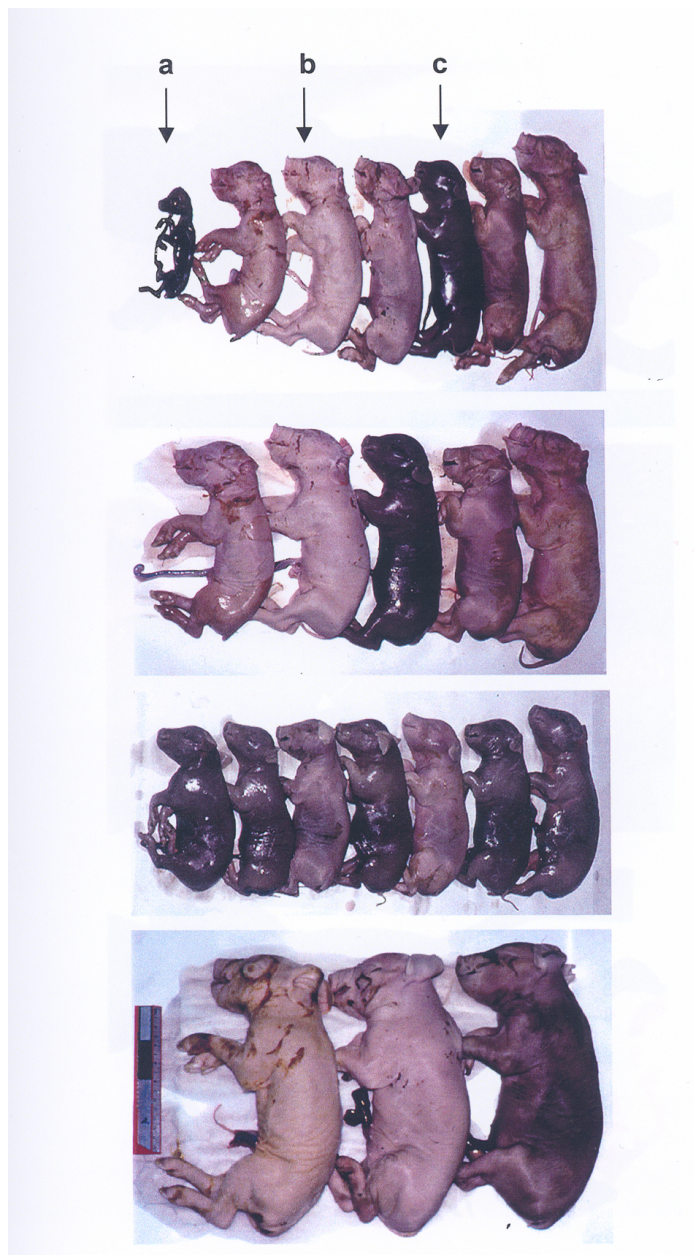
Respecto al número de lechones nacidos débiles, hubo un 0%, 8,7%, 4,6% y 20,4% en los grupos A, B, C y D, respectivamente, presentando diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ). Todas las hembras del grupo D parieron entre 2 y 3 lechones débiles, mientras que en los grupos B y C solamente dos camadas en se hallaron lechones con peso inferior a los 0,9k.

Tabla 5. Datos productivos de las cerdas de los grupos A, B, C y D.

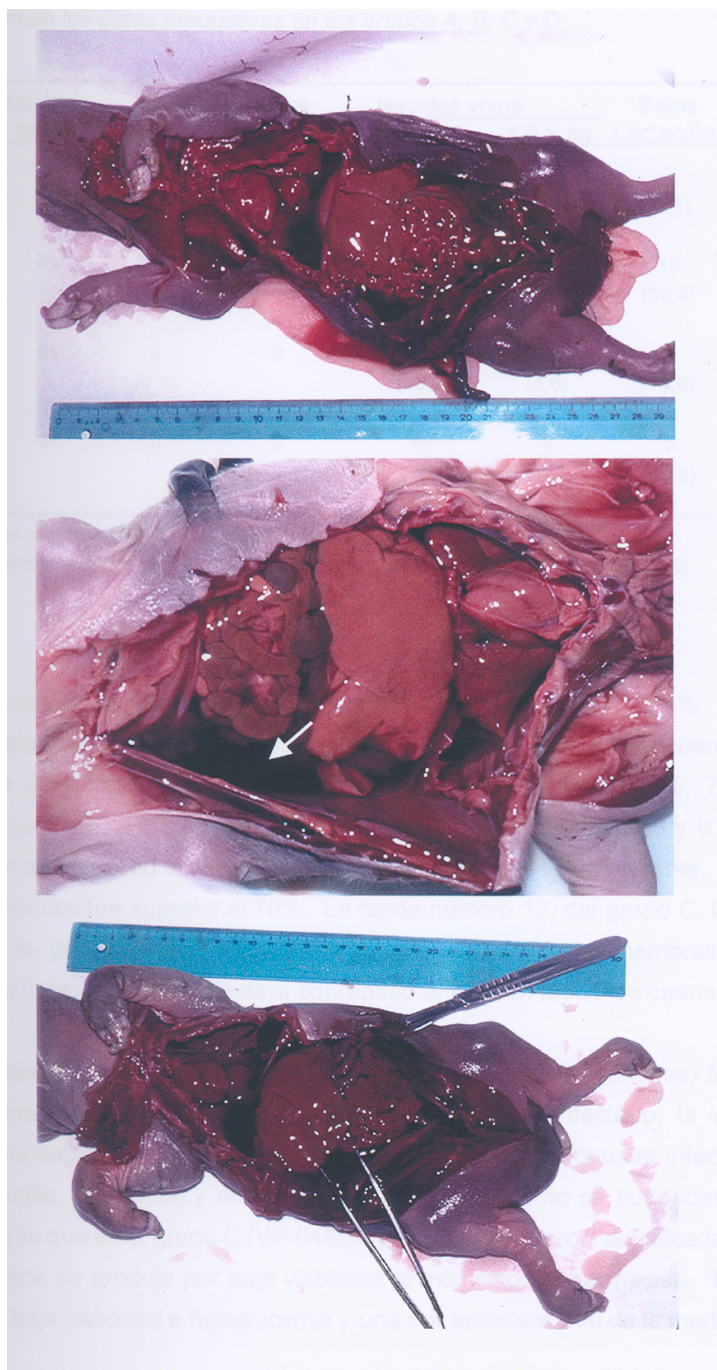
Grupo	Nº de Cerdas	Días de gestación	Nacidos totales	Nacidos muertos		Nacidos vivos		Bajas Lactación	Lechones destetados	Viabilidad al <sup>1</sup>		Peso promedio al	
				totales	momias/l	totales	< 0,9 kg			nacimiento	destete	nacimiento	destete
A	1	113	11	0	-	11	0	0	11	100	100	1,2	4,8
A	2	115	9	0	-	9	0	1	8	100	88,8	1,4	5,6
A	3	113	10	0	-	10	0	0	10	100	100	1,3	5
A	4	114	9	0	-	9	0	1	8	100	88,8	1,2	5,8
B	5	112	7	0	-	7	0	6	1	100	14,3	1,5	2,9
B	6	113	12	2	1	10	3	7	3	83,4	25	1,2	1,7
B	7	120	14	4	1	10	0	0	10	71,4	71,4	1,3	4,6
B	8	115	13	1	-	12	1	2	10	92,3	76,9	1,2	3,4
C	9	115	11	0	-	11	1	1	10	100	90,9	1,4	5,6
C	10	114	9	0	-	9	1	2	7	100	77,7	1,3	5,7
C	11	116	14	0	-	14	0	1	13	100	92,9	1,2	4,6
C	12	110	9	4	-	5	0	1	4	55,5	44,4	1,2	5,4
D	13	114	9	0	-	9	2	2	7	100	77,7	1,2	5,8
D	14	115	9	0	-	9	3	0	9	100	100	0,9	4,3
D	15	116	15	0	-	15	2	3	12	100	80	1,2	4,4
D	16	113	11	0	-	11	2	0	11	100	100	1,2	4,4

1: viabilidad de la camada: número de lechones vivos dividido al número total de lechones nacidos.





*Figura 5. Aspecto exhibido por alguna de las camadas afectadas por el VSRRP. En la foto superior: a: feto momificado tipo I, b: nacido muerto de aspecto normal, c: feto momificado tipo II*



*Figura 6. Aspecto macroscópico de los fetos momificados tipo II. Destaca la abundante cantidad de líquido sanguinolento en cavidad abdominal.*

Tabla 6. Resumen de los datos productivos en los grupos A, B, C y D.

Grupo	N <sup>o</sup> de Cerdas	Nacidos totales	Nacidos muertos		Nacidos vivos		Bajas Lactación	Lechones destetados
			totales	muertos	totales	< 0,9 kg		
A	4	39	0	0	39 <sup>a</sup> (100)	0	2 (5,1)	37 <sup>a</sup> (94,9)
B	4	46	7 (15,2) <sup>*</sup>	2	39 <sup>a</sup> (84,8)	4 (8,7)	15 (30,4)	15 <sup>b</sup> (61,5)
C	4	43	4 (9,3)	0	39 <sup>a</sup> (90,7)	2 (4,6)	5 (11,6)	34 <sup>a</sup> (87,2)
D	4	44	0	0	44 <sup>a</sup> (100)	9 (20,4)	5 (11,3)	39 <sup>a</sup> (88,6)

\* los números entre paréntesis corresponden al valor porcentual

a,b: los números dentro de una columna con la misma letra no son estadísticamente significativos ( $p > 0,05$ )

Las bajas ocurridas durante el período de lactación, fueron de un 5,1%, 32,6%, 11,6% y 11,3% en los grupos A, B, C y D, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Como consecuencia, la viabilidad global al destete para los grupos A, B, C y D fue de un 94,9%; 52,2%; 79,1% y 88,6%, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 7). En el grupo B, las hembras número 5 y 6 presentaron los niveles más bajos de viabilidad al destete, un 14,3% y un 25%, respectivamente, mientras que en los otros dos individuos fue superior al 70%. La cerda número 12, del grupo C, tuvo la viabilidad menor dentro de su grupo, un 44,4%, en tanto que en el resto de las hembras fue superior al 77%. En el grupo D, la viabilidad al destete sobrepasó el 77% en todos los casos.

Las muertes post natales en el grupo control no infectado (2 lechones) fueron atribuidas a injuria (aplastamiento por la madre). En el grupo B, control infectado, la injuria de origen materno fue responsable de 4 bajas, otros 4 lechones murieron por causas infecciosas (diarrea, pericarditis-peritonitis, neumonía) y en los 3 restantes lechones no se pudo identificar el origen de la baja. Mientras que en el grupo C (VP-046BIS), 3 muertes fueron adjudicadas a injuria de la madre y una muerte se produjo por baja viabilidad al momento del nacimiento. En el grupo D, 4 bajas fueron por baja viabilidad e hipoglucemia y una por aplastamiento de la madre.

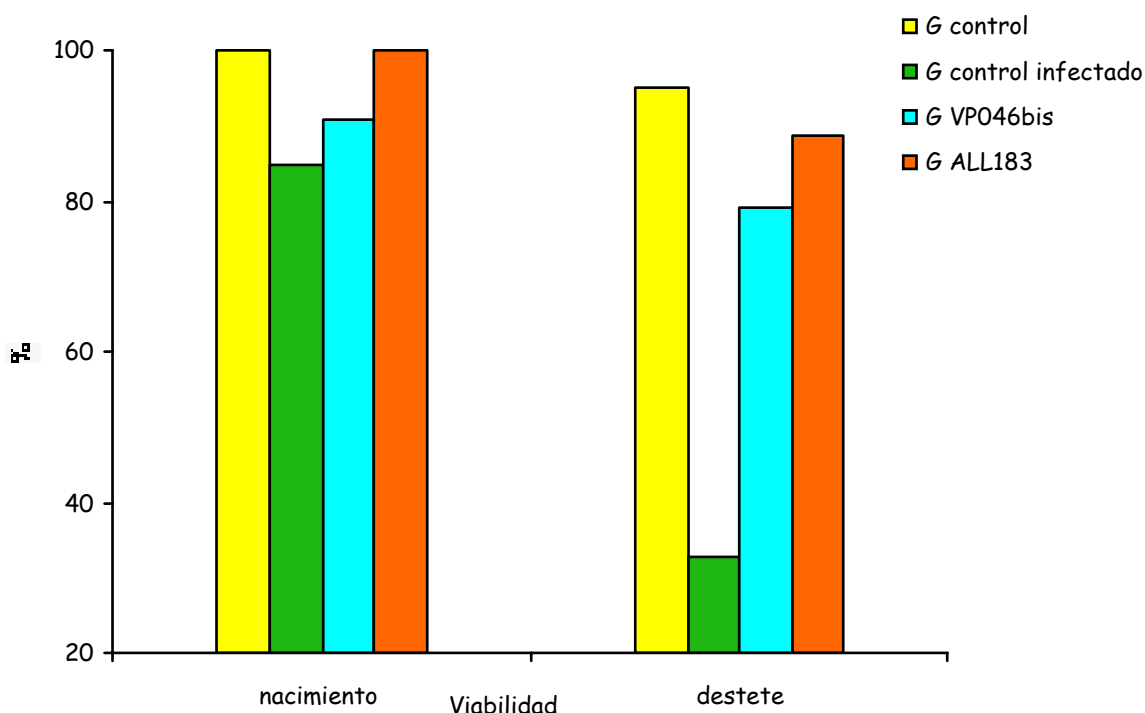
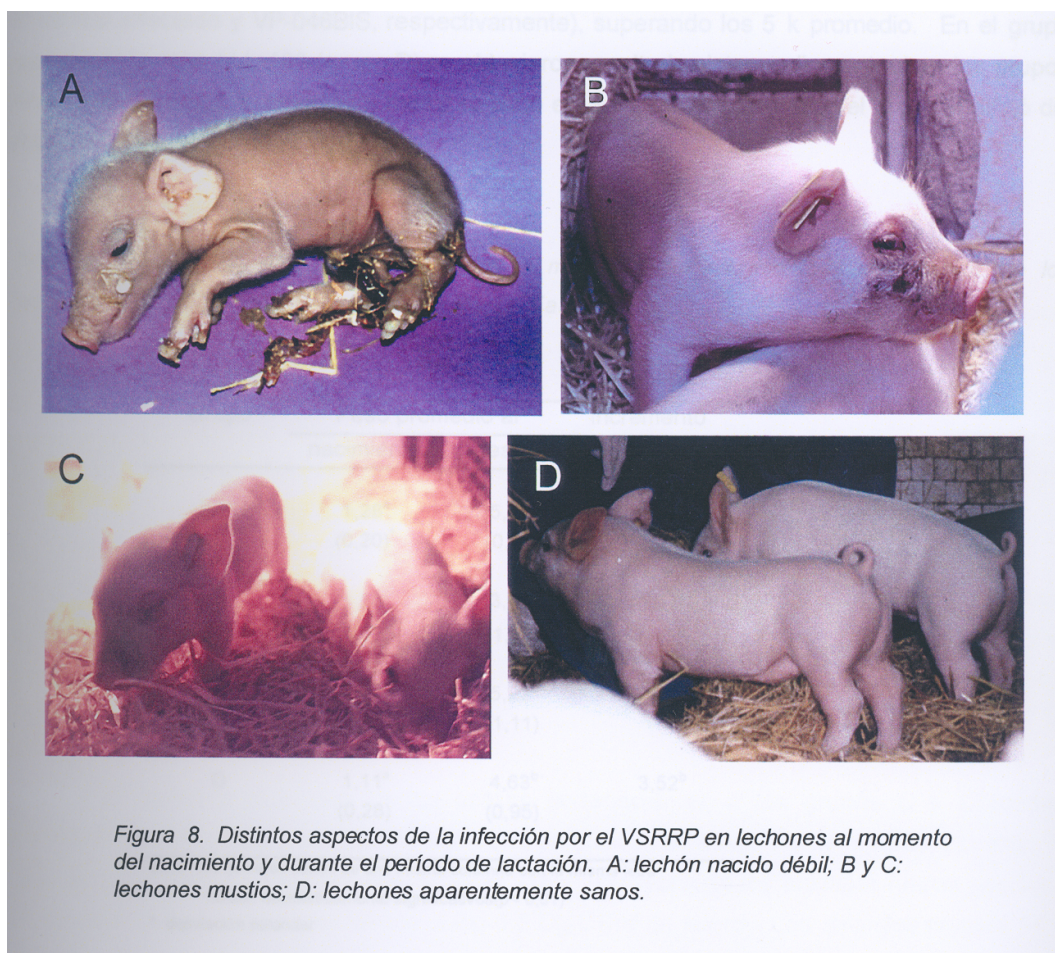


Figura 7. Viabilidad promedio de los lechones en los grupos A, B, C y D, al momento del nacimiento y del destete. El grupo B presentó diferencias estadísticamente significativas en el momento del destete ( $p < 0,05$ ).

Durante el período de lactación, los lechones pertenecientes a los grupos A, C y D no manifestaron signos de enfermedad. En contraste, la mayoría de los cerdos del grupo B tuvieron algún signo clínico a lo largo de este período. Estos signos incluyeron diarrea, disnea y más frecuentemente un aspecto general de enfermedad. La diarrea se inició en los primeros días de vida, a excepción de la camada de la cerda número 5 donde este signo comenzó después del día 11 de vida. Todas las camadas recibieron tratamiento parenteral con gentamicina. Las camadas de las hembras 5 y 8 manifestaron signos respiratorios, que fueron menguando hacia los 15 días de vida. Estos signos fueron particularmente severos en los lechones de la cerda número 8, con respiración abdominal, incluso en estado de reposo, asumiendo a menudo una posición de "perro sentado". Cada vez que estos animales eran sometidos a las maniobras de extracción de sangre, daban la impresión de que sucumbirían por la severa insuficiencia respiratoria que presentaban. Además, en un lechón se observó una conjuntivitis severa, acompañada con edema de párpados, signo que también se observó en otros 3 lechones. A pesar de ello, la mayoría sobrevivió al período de lactación, a excepción de dos lechones, uno de los cuales murió aplastado y otro por causas desconocidas. En la figura 8





se muestra el aspecto observado en algunos lechones de las camadas afectadas por el VSRRP.

El peso promedio de los lechones al nacimiento entre los grupos no fue estadísticamente diferente cuando se incorporó a la madre como una fuente de variación ( $p > 0,05$ ) (Tabla 7). En cuanto a los valores individuales la camada de la hembra número 14 (grupo ALL-183) presentó el valor promedio más bajo, 0,9 kg, mientras que el máximo fue observado en la camada de la cerda número 5 (grupo B), con 1,5 kg.

El incremento de peso obtenido por los lechones destetados fue similar en los grupos A y C (control infectado y VP-046BIS, respectivamente), superando los 5 kg promedio. En el grupo que recibió la cepa ALL-183 (grupo D) se obtuvieron resultados intermedios entre los dos grupos anteriores y el grupo B, cuyo valor medio se situó en 3,63 kg. En tanto que el grupo B difirió del resto de los grupos ( $p < 0,0001$ ).

Tabla 7. Pesos medios por grupo obtenidos al momento del nacimiento y del destete de los lechones, así como la ganancia de peso a los 21 días.

Grupo	Peso promedio al		incremento de peso
	nacimiento	destete	
A	1,28 <sup>a</sup> (0,20)*	5,26 <sup>a</sup> (0,79)	4,12 <sup>a</sup>
B	1,28 <sup>a</sup> (0,27)	3,63 <sup>c</sup> (1,10)	1,03 <sup>c</sup>
C	1,27 <sup>a</sup> (0,28)	5,22 <sup>a</sup> (1,11)	3,94 <sup>a,b</sup>
D	1,11 <sup>a</sup> (0,28)	4,63 <sup>b</sup> (0,95)	3,52 <sup>b</sup>

a,b,c: los números dentro de una misma columna con la misma letra no son estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ )

\*: desviación estandar

#### **4.1.1.3 Detección de anticuerpos**

Los sueros de las hembras recogidos en el día 90 de gestación, antes de la inoculación con el VSRRP fueron negativos a la presencia de anticuerpos específicos contra dicho agente, mediante las técnicas de ELISA y seroneutralización vírica. Los animales del grupo A mantuvieron la condición de seronegativos durante todo el período de estudio. Por el contrario, las hembras de los grupos B, C y D fueron seropositivas cuando se analizaron, por las mismas técnicas, los sueros correspondientes al momento de sacrificio.

#### **4.1.1.4 Detección del virus**

##### **i. En cerdas**

Los resultados de los intentos de aislamiento vírico en las muestras de suero e hisopos nasales obtenidas a lo largo del período de estudio figuran en la tabla 8.

Las muestras tomadas en todos los animales en el día 90 de gestación, antes de la inoculación experimental con el VSRRP, fueron negativas cuando se intentó el aislamiento del virus en cultivos de MAP, así como en la línea celular MARC-145.

En los días 3 y 5 p.i., la mayoría de los animales del grupo control infectado fueron positivos al aislamiento vírico realizado sobre cultivos de MAP. La viremia se prolongó hasta el día 21 p.i. en la hembra número 6 y los títulos alcanzados fueron en todos los casos  $\leq \log 4,2$   $DI_{50}CT/ml$  de suero.

Las muestras recogidas de las cerdas pertenecientes a los grupos C y D (cepas atenuadas) fueron negativas al aislamiento vírico en cultivos de MAP. Por el contrario, cuando el aislamiento se intentó en la línea celular MARC-145, la mayoría de los animales fueron positivos en los días 3 y 5 p.i., con títulos víricos  $\leq \log 3,6$   $DI_{50}CT/ml$  de suero. Los animales número 14 y 15, del grupo D, fueron siempre negativos.

Todas las muestras procedentes del grupo A, fueron negativas al aislamiento del VSRRP en ambos sistemas celulares.

Todas las muestras de hisopos nasales y heces de los grupos A, C y D, fueron negativas al aislamiento del virus en cultivos de MAP. Sin embargo, en las hembras 5 y 6 del grupo B, se detectó el virus en hisopos nasales correspondientes al día 5 p.i. en ambas y además en el día 3 p.i. en la cerda número 5.

Las muestras de órganos obtenidas a la necropsia fueron, en su mayoría, negativas al aislamiento del virus en cultivos de MAP y en la línea MARC-145. Solamente las amígdalas de la cerda número 5 fueron positivas en cultivos de MAP.

*Tabla 8. Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP y en MARC-145 a partir de las muestras de suero recogidas antes y después de la inoculación con el VSRRP, en las cerdas de los grupos B, C y D.*

Grupo	nº cerda	Días de obtención de las muestras							
		suero							hisopo nasal <sup>b</sup>
		0	3	5	9	12	21	28	3 5
B	5	- / -	2,5/- <sup>a</sup>	2,6/-	2,5/-	-/-	-/-	-/-	+ (<1) + (<1)
B	6	- / -	2,5/-	3,5/-	3,9/-	3,5/-	2/-	-/-	- + (<1)
B	7	- / -	2,2/-	2,9/-	4,2/-	-/-	-/-	-/-	- -
B	8	- / -	2,5/-	<1/-	'-/-	-/-	-/-	-/-	- -
C	9	- / -	- / 2,6	- / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
C	10	- / -	- / 2,3	- / 3	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
C	11	- / -	- / -	- / 2,3	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
C	12	- / -	- / 2,4	- / 2	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
D	13	- / -	- / 3,4	- / 3,6	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
D	14	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
D	15	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- -
D	16	- / -	- / 2,9	- / 3	- / -	- / -	- / -	- / -	- -

a: aislamiento vírico en cultivos de MAP/ en la línea MARC-145; (-) negativo, en las muestras positivas se refleja el título vírico calculado como DI50 CT/ml de suero y expresado en la forma de log X.

b: aislamiento vírico en cultivo de MAP



## **ii. Lechones**

En las diferentes muestras analizadas de los lechones pertenecientes a las hembras del grupo A fue imposible detectar el VSRRP. Por otra parte, se detectó infección transplacentaria en 4 camadas del grupo control infectado, en 2 del grupo C VP-046BIS) y en 3 del grupo D (ALL-183), mediante aislamiento del virus en cultivos de MAP (tabla 9).

El VSRRP fue detectado en un 89,1%; 18,6% y 31,8% del total de lechones nacidos de los grupos B, C y D, respectivamente (figura 9).

En la mayoría de los lechones nacidos muertos se pudo identificar la presencia del virus.

El porcentaje de lechones positivos en la muestra de suero correspondiente al día 0 (previa ingestión de calostro), se observó un número significativamente mayor de animales positivos en el grupos B (82,8%), comparado con los grupos C y D, donde fue inferior al 6%. En ese momento, solamente una camada de dichos grupos se detectó con el virus.

En el día 21 de vida, casi el 100% de los individuos del grupo B fueron virémicos, contra un 0% y 17,9% de los grupos C y D, respectivamente. En éste último grupo, el alto porcentaje está representado por el comportamiento de la camada de la hembra número 16, que pasa de un lechón positivo en el día 0 a 7 positivos en el día 21.

Si se consideran las distintas muestras recogidas en la necropsia sumadas a las muestras de suero, se advierte un incremento en el número de individuos positivos. De esta forma, en el grupo C se detecta un 14,7% de animales con el VSRRP, pertenecientes a las hembras número 9 y 12; mientras que en el grupo D también se detectan casos positivos en la hembra número 14, acumulando un total de 35,3% de lechones con aislamiento vírico positivo.

Tabla 9. Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y órganos obtenidos de los lechones pertenecientes a los grupos B, C y D.

Grupo	n <sup>1</sup> / <sub>4</sub> cerda	Total nacidos	Nacidos muertos *		Nacidos vivos - d'as de toma de muestra					Bajas en lactaci—n	Lechones destetados *
			momias II	normal	0	4	8	15	21		
B	5	7/7 <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	-	7/7	6/6	6/6	5/5	1/1	6/6	1/1
B	6	8/12	-	1/2	3/10	1/8	3/8	4/8	2/3	4/7	3/3
B	7	13/14	0/1	3/3	10/10	10/10	10/10	8/10	10/10	-	10/10
B	8	13/13	1/1	-	4/12	11/11	11/11	11/11	10/10	2/2	12/12
C	9	3/11	-	-	2/11	0/10	0/10	0/10	0/10	0/1	3/10
C	10	0/9	-	-	0/9	0/8	0/7	0/7	0/7	0/2	0/7
C	11	0/14	-	-	0/14	0/13	0/13	0/13	0/13	0/1	0/13
C	12	5/9	-	3/4	0/5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/1	2/4
D	13	0/9	-	-	0/9	0/8	0/8	0/7	0/7	0/2	0/7
D	14	5/9	-	-	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	-	5/9
D	15	2/15	-	-	0/15	0/12	0/12	0/12	0/12	2/3	0/12
D	16	7/11	-	-	1/11	2/11	1/11	4/11	7/11	-	7/11

\* : aislamiento vírico a partir de muestras de suero, —rganos y/o MAP.

a: lechones positivos / lechones analizados; b: ausencia de individuos en la categoría

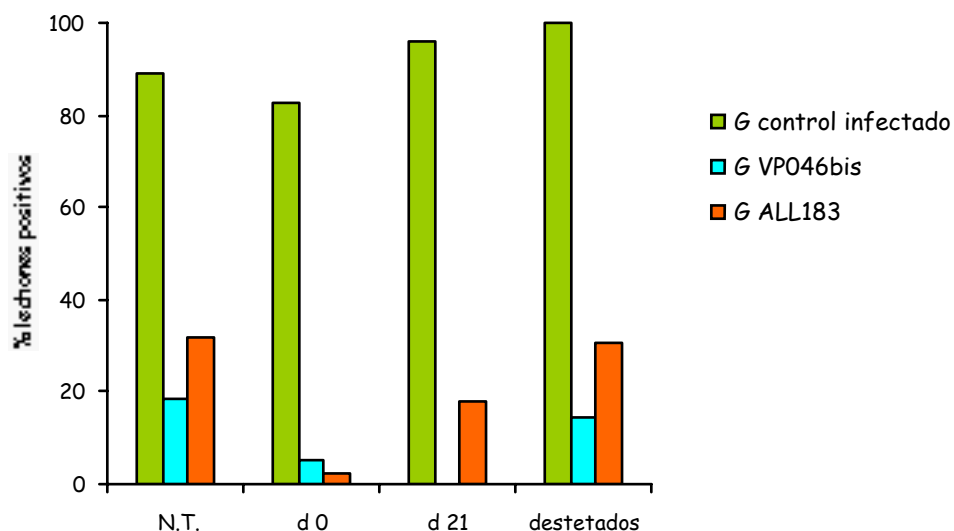


Figura 9. Porcentaje de lechones con aislamiento positivo del VSRPP, en cultivos de MAP, correspondiente a los grupos B, C y D. N.T: lechones nacidos totales; d0: viremia en los lechones en el día 0; d 21: viremia en el día 21; NV: aislamiento a partir de suero, órganos o MAP de los lechones destetados. El número de camadas infectadas fue de 4/4; 2/4 y 3/4, para los grupos B, C y D, respectivamente

En los órganos recogidos a la necropsia de todos los lechones nacidos vivos y con aislamiento vírico positivo, el VSRPP se detectó con mayor frecuencia en muestras de amígdalas, GLSM. y MAP (figura 10).

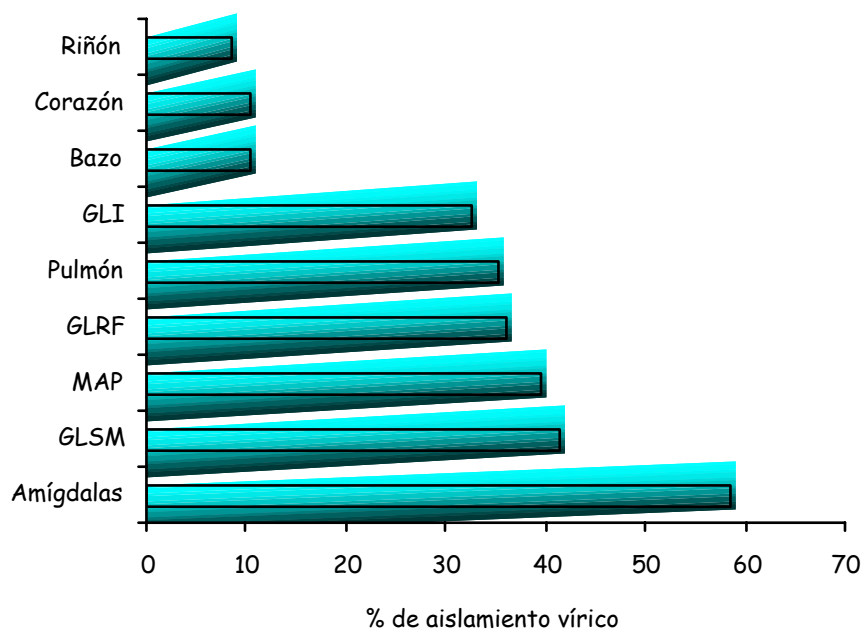


Figura 10. Porcentaje de muestras con aislamiento vírico positivo, en los lechones infectados nacidos vivos.

GLSM.: ganglio linfático submandibular; MAP: macrófago alveolar porcino; GLRF.: ganglio linfático retrofaríngeo; GLI: ganglio linfático inguinal.

#### 4.1.2. Discusión

Como condición general, una VA debe ser biológicamente segura y no inducir reacciones adversas en el animal vacunado. En las vacunas contra el VSRRP, la primera de estas premisas es la que presenta los mayores inconvenientes, como quedó demostrado por diversas investigaciones llevadas a cabo con las VA conteniendo cepas del subtipo americano del virus. Entre dichos trabajos se cita la persistencia del virus vacuna en el organismo (Mengeling *et al.*, 1996a,c; Wills *et al.*, 1995, 1997), la posible transmisión del virus a otros animales (Torrison *et al.*, 1996; Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1998a), así como la inducción de infección congénita con el consecuente nacimiento de lechones persistentemente infectados (Mengeling *et al.*, 1996b).

El presente estudio se diseñó para conocer la seguridad, bajo condiciones experimentales de laboratorio, de las cepas del VSRRP incluidas en las VA AmervacSRRP® y Pysrvac-183®. El modelo utilizado pretendió incorporar las condiciones de máxima exigencia, tales como aplicar dosis 10 veces superiores a las recomendadas, por la vía más sensible para la reproducción de la enfermedad (intranasal) y en una población de alto riesgo (cerdas en el último tercio de gestación). Los resultados se evaluaron en base a la inocuidad y la capacidad de persistencia del virus en las madres, así como de su habilidad para atravesar la barrera placentaria e inducir fallo reproductivo y el nacimiento de lechones persistentemente infectados.

##### 4.1.2.1 Inocuidad de la cepa vacunal en las hembras

La inoculación intranasal de las cepas vacunales VP-046 BIS y ALL-183 a cerdas de entre 87 y 93 días de gestación no produjo signos clínicos generales atribuibles al VSRRP, a pesar de quedar demostrada la infección por el desarrollo de anticuerpos específicos y en la mayoría de los casos por el aislamiento del virus.

Estos resultados son bastante similares a los descritos por Mengeling *et al.* (1996b), que inocularon cerdas con  $10^7$  DI<sub>50</sub>CT de la cepa vacunal RespPRRS® por vía intranasal y no observaron modificaciones significativas en la temperatura corporal ni alteraciones del apetito.

Por el contrario, los animales que recibieron las cepas virulentas del VSRRP, manifestaron algunos signos leves relacionados a trastornos del apetito, siendo su

presentación de forma esporádica y de corta duración. Estas observaciones también fueron descritas por otros autores (Loula, 1991; Blackburn, 1991, Christianson *et al.*, 1992; Gordon, 1992; Terpstra *et al.*, 1992, Prieto *et al.*, 1996a,b, 1997a), quienes coinciden en que la inapetencia o anorexia, cuando aparecen, son durante un breve período y normalmente en los primeros días después de la infección. En ninguno de los animales empleados se presentaron signos respiratorios, como los descritos por autores que utilizaron cepas virulentas para la inoculación de los animales (Blackburn, 1991; Loula, 1991; Gordon, 1992). Sin embargo, Prieto *et al.* (1996a,b, 1997) y Mengeling *et al.*, (1994) tampoco describieron la presencia de tales fenómenos. La expresión clínica de la infección por el VSRRP parece tener un fuerte componente de respuesta individual a la infección, pudiendo pasar desapercibida o bien manifestar signos severos.

Las cepas vacunales no indujeron un aumento significativo de la temperatura rectal, a diferencia de las cepas virulentas. Estos resultados parecen indicar que las cepas VP-046 BIS y ALL-183 poseen una virulencia menor en este sentido, coincidiendo con los resultados de Mengeling *et al.* (1994) y Gorcyca *et al.* (1997a,b) en cuanto a la cepa ATCC 2322 atenuada utilizada como inmunógeno.

Por otra parte, cuando se emplean cepas virulentas la literatura refleja que tan sólo el 30% de los animales infectados alcanzan temperaturas superiores a los 40°C, lo que concuerda con nuestros resultados del grupo control infectado. Plana Durán *et al.* (1992) en sus trabajos sobre la reproducción experimental de la enfermedad con una cepa española, publica que en ninguna de las 3 cerdas inoculadas en el día 77 de gestación se produce pirexia. Estas diferencias podrían atribuirse a la ruta de administración del inoculo, que en este caso fue 50% intranasal y 50% intramuscular, a la diferencia entre las cepas empleadas en ambos estudios, o simplemente al reducido número de animales incluidos en los experimentos.

En cuanto a los glóbulos blancos, cabe destacar que los tres grupos de cerdas que recibieron el virus presentaron un descenso en los recuentos de dichas células entre los días 3 y 5, fundamentalmente, sin presentar diferencias estadísticas.

No obstante, el número de animales que padeció de linfopenia fue inferior entre el grupo C y D, que en el B, donde involucró a todos los individuos.

Nuestros resultados están en concordancia con los publicados por Christopher-Hennings *et al.* (1997), donde no observaron diferencias en los valores hemáticos cuando vacunaron a verracos con RespPRRS<sup>®</sup>, por la vía intramuscular y con dosis superiores a la recomendada. Por el contrario, las observaciones de las pruebas de seguridad de la vacuna americana RespPRRS<sup>®</sup>, llevadas a cabo por Gorcyca *et al.* (1997b), advierten una leucopenia en el día 3 p.v., cuando la vacuna fue administrada a 10 veces su concentración normal.

#### **4.1.2.2 Persistencia de las cepas del VSRRP en las hembras**

Las cerdas inoculadas con las cepas virulentas del SRRP se comportaron de acuerdo a lo esperado en relación a la presencia del virus en sangre. Dichos animales fueron positivos al aislamiento del VSRRP, en MAP, desde el día 3 p.i. hasta el día 21 p.i en la mayoría de los casos.

Estos resultados son bastantes similares a los publicados por Christianson *et al.* (1993), Mengeling *et al.* (1995) y Prieto *et al.* (1997a) que describieron viremias de 9 a 14 días en hembras gestantes. Sin embargo, cuando la infección experimental se llevó a cabo en lechones, algunos autores publicaron la presencia constante del virus en el suero hasta el día 28 o 35 p.i. (Rossow *et al.*, 1994; Yoon *et al.*, 1993, respectivamente). Estas diferencias en la duración de la viremia hallada por los diferentes trabajos puede obedecer a varios factores. Entre ellos, podemos citar el tipo y virulencia de la cepa del VSRRP utilizada, las dosis infectivas empleadas y la edad de los animales, entre otros. Asimismo, las discrepancias entre los distintos resultados podrían estar basadas en la sensibilidad de la técnica empleada para la detección del virus.

En relación a esto último, cuando se intentó el aislamiento del virus a partir de las muestras de suero de los animales de los grupos C y D en cultivos de MAP, los resultados fueron negativos. Por el contrario, cuando los mismos sueros se utilizaron sobre cultivos de células MARC-145, se detectaron viremias en la mayoría de estos animales entre los días 3 y 5 p.i.; en tanto que las cerdas inoculadas con las cepas de campo fueron negativas.

La incapacidad de estas cepas vacunales de producir ECP en cultivos de MAP, podría ser una consecuencia de la adaptación que sufrieron al recibir pases sucesivos en la línea celular. Aparentemente, estas cepas poseen una menor capacidad de infectar, o bien

de replicarse, en las células diana, dando lugar a un período de viremia menor que el de las cepas virulentas.

Mengeling *et al.* (1996b) describieron que la mayoría de las cerdas que recibieron la cepa de la vacuna americana RespRRS<sup>®</sup>, fueron virémicas entre los días 7 y 11 p.i., principalmente. Christopher-Hennings *et al.* (1997), mediante la inoculación de verracos, hallaron viremias en todos los animales en el día 4 p.i., siendo uno de ellos positivos hasta el día 25 p.i.. Por su parte, Shin *et al.* (1997) trabajando con verracos describieron viremias de entre 2 y 12 días p.v. Como puede observarse, en los trabajos citados precedentemente, la duración de la viremia es más prolongada que la descrita por nosotros.

Dichas diferencias pueden obedecer a una mejor adaptación de la cepa de la vacuna americana a la línea celular. Cabe recordar que la cepa VP046-BIS fue obtenida en la línea celular MA-104, mientras que la cepa ALL-183 (Pyrsvac-183<sup>®</sup>) se replicó en la línea Swine Testis, líneas donde previsiblemente dichas cepas del VSRRP poseen una máxima expresión. Quizás, esto nos esté dando una visión sesgada, dado que si asumimos que estas cepas poseen una adaptación máxima a la línea celular donde sufrieron los pases sucesivos, tendríamos entonces, que realizar el aislamiento en dichas líneas para poder efectuar una comparación imparcial.

Por otra parte, el mayor número de muestras positivas en el grupo C, podría atribuirse a una mejor expresión de la cepa vírica empleada en la línea MARC-145, teniendo en cuenta que es un clon estable de la línea MA-104.

Por otra parte, nuestros resultados discrepan con los publicados por Llanos y *et al.* (2000), utilizando la vacuna Pyrsvac-183<sup>®</sup>, en cuanto al momento de aparición de la viremia. Estos autores detectaron, en muestreos semanales, el 100% de los individuos positivos en la segunda semana p.v., en tanto en la muestra de la 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> semana fueron negativas. Posiblemente, la pequeña discordancia con nuestro estudio pueda estar ocasionada por la diferencia en los tiempos de muestreo, Llanos *et al.* (2000) utilizaron un muestreo semanal y todos los positivos fueron detectados en el día 10 p.v., no obstante no especifica el día de recolección de las muestras durante la primera semana.

La eliminación del VSRRP solamente se detectó en algunas muestras de los animales control infectados. En los trabajos de patogénesis, realizados por Rossow *et al.*



(1995), tampoco pudieron recuperar el virus a partir de heces y de hisopos nasales cuando inocularon lechones con la cepa de referencia americana. Por el contrario, nuestros resultados discrepan de aquellos obtenidos por Prieto *et al.* (1997a,b) que describieron aislamientos frecuentes a partir de heces y secreciones nasales de animales inoculados experimentalmente con cepas europeas del VSRRP, generalmente coincidiendo con el período virémico, e incluso hasta en el día 23 p.i, en heces. Estas discrepancias entre los resultados obtenidos entre diversos autores llevaron a Yoon *et al.* (1993) a la conclusión de que el VSRRP posee un patrón poco constante de eliminación, asociado al período de viremia.

No obstante, para poder descartar la ausencia de eliminación de las cepas vacunales debería haberse realizado el aislamiento en las líneas celulares específicas para cada cepa. Nuestros resultados están en contraposición a los trabajos llevados a cabo por Llanos *et al.* (2000), que describieron el aislamiento de la cepa atenuada All-183, a partir de orina, heces y exudado nasal en la 2º, 3º y 4º semana posteriores a la administración de la vacuna. Posiblemente, estas desaveniencias puedan obedecer a que dichos autores emplearon la línea celular MARC-145 para realizar el aislamiento, que tal como quedó demostrado en el caso de las viremias tiene una mayor sensibilidad que los MAP para captar las cepas atenuadas del VSRRP.

Finalmente, el análisis de nuestros resultados sobre eliminación de las cepas vacunales VP043bis y ALL183 parecen indicar que dichas cepas poseen una menor capacidad de replicación *in vivo* y por tanto de eliminación. A pesar de ello, algunos animales son capaces de producir viremias con títulos similares a los inducidos por cepas virulenta, por tanto no es prudente eliminar por completo la diseminación del virus a través de las secreciones nasales y por heces, sobretodo teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Llanos *et al.* (2000).

No obstante, es conveniente recordar que en este trabajo la inoculación de las cepas vacunales se realizó utilizando la vía más sensible para producir infección (intranasal) que cuando se aplica como vacuna, y por otro lado la dosis administrada también fue mayor, disminuyendo probablemente la eliminación cuando se utiliza en la forma y dosis recomendada para su aplicación.

#### 4.1.2.3 Implicaciones reproductivas-productivas

El VSRRP ejerce un efecto negativo sobre las cerdas gestantes, principalmente durante el último tercio de la gestación, dando lugar a un fallo reproductivo bastante constante, caracterizado por abortos tardíos, partos prematuros o tardíos, aumento en el número de lechones nacidos muertos y nacidos débiles, que pueden estar infectados al nacimiento.

En el presente estudio, se produjeron dos partos fuera del período de gestación considerado normal (114 días  $\pm$  3 días). En una cerda del grupo C (AmervacPRRS®) el parto se adelantó al día 110 de gestación, mientras que una hembra del grupo B parió a los 120 días de gestación. En los pocos trabajos publicados sobre seguridad de las cepas vacunales en cerdas, normalmente no se menciona este aspecto. No obstante, Mengeling *et al.* (1996b), describieron períodos normales de gestación en 4 hembras inoculadas con la cepa del VSRRP contenida en la vacuna americana RespPRRS; mientras que cuando inocularon otras 3 cepas virulentas en 12 animales, en 3 de ellos los partos sucedieron entre los días 118 y 124 de gestación. Estos últimos datos concuerdan con nuestros hallazgos, e indican que en aproximadamente un 25% de las cerdas inoculadas con cepas virulentas del VSRRP, la gestación se prolonga más allá del período de gestación estipulado como normal.

Por otro lado, si consideramos que el adelantamiento del parto se presenta en una frecuencia baja, la probabilidad de captar dicha alteración utilizando pocos animales disminuye y ello explicaría, quizás, la discrepancia entre nuestro trabajo y el de Mengeling *et al.* (1996b), en cuanto a los resultados obtenidos con las cepas vacunales.

Un dato a considerar, es que en nuestro estudio los dos extremos citados coinciden con las hembras que parieron mayor número de lechones nacidos muertos, lo que quizás podría haber influido en el desencadenamiento del parto.

Por lo observado, aparentemente la cepa vacunal ALL183 podría tener un efecto menor que la cepa VP046bis en cuanto a la modificación del período de gestación.

El número de lechones por camada no presentó diferencias entre los grupos analizados, hallándose dentro de los valores medios normales. Esto resulta previsible, ya que ello depende de diversos factores que pueden ejercer su influencia durante las primeras

etapas de la gestación y en el presente trabajo la inoculación se realizó en el día 90 de gestación, cuando el tamaño de la camada ya estaba determinado.

Para valorar el efecto que la infección por el VSRRP tiene sobre las camadas se tuvieron en cuenta distintos parámetros productivos. Diversos estudios previos al respecto, demostraron que el VSRRP provoca un mayor número de lechones nacidos muertos y fetos momificados de gran tamaño, así como un incremento en el número de lechones nacidos débiles.

Los datos aportados por el grupo control infectado discrepan con otras publicaciones en relación al porcentaje de momias de tipo II, fundamentalmente, donde los porcentajes suelen ser superiores al 15%, llegando incluso a ser del 70% (Plana Durán *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1996b; Gorcyca *et al.*, 1997). Nosotros creemos que esta disparidad puede explicarse, tanto por el factor individual como por posibles diferencias en la virulencia de las cepas utilizadas.

Bajo nuestras condiciones experimentales, las cepas vacunales no inducen muerte y momificación de los fetos como sucedió en el grupo B. Estos datos coinciden con los publicados por Mengeling *et al.* (1996b) y por Llanos *et al.* (2000).

En referencia al porcentaje de mortinatos, nuestros datos concuerdan con los hallados en la literatura, si bien en este punto los resultados suelen ser bastantes variables. Gorcyca *et al.* (1997), utilizando la cepa contenida en la vacuna RespPRRS<sup>®</sup>, describieron un 14% y un 7% de mortinatos, aplicando 1x y 10x la dosis vacunal, respectivamente, mientras que los controles no infectados estuvieron en el orden del 7,5% al 13% y los inoculados con la cepa campo en un 22%. Por otra parte, Mengeling *et al.*, en similares condiciones, obtuvieron un 6,1%, 4,5% y menos de un 11,3% cuando utilizaron animales sin tratar, inoculados con la cepa de la vacuna RespPRRS<sup>®</sup>, o con una de 3 diferentes cepas virulentas, respectivamente. Otros autores (Christianson *et al.*, 1992 y Gorcyca *et al.*, 1997a) publicaron cifras cercanas al 20% de lechones nacidos muertos normales de hembras inoculadas con la cepa VR2332. A igual que con los fetos momificados tipo II, pensamos que el factor "individuo" puede desempeñar un papel muy importante, asociado a la virulencia de la cepa actuante así como las dosis infectivas del virus administrado.

Una mención especial merece la hembra número 12 del grupo C (VP046BIS), que fue la única de dicho grupo que parió lechones nacidos muertos. Nosotros creemos que la

muerte de estos lechones puede ser a consecuencia de la infección por la cepa vacunal del VSRRP, dado que en 3 de ellos se aisló el virus, así como de alguno de sus hermanos destetados. No obstante, la muerte debe haberse producido muy cercana a la fecha del parto, no dando tiempo suficiente para producir la descomposición de los fetos.

En cuanto a los lechones nacidos débiles llama la atención el alto porcentaje obtenido en el grupo D (ALL183), donde en todas las camadas nacieron entre 2 y 3 de estos animales. Por el contrario, en los grupos B y C solamente estuvieron afectadas el 50% de las camadas. Nuestros resultados discrepan de las observaciones obtenidas en estudios de patogenicidad del VSRRP, donde se describió hasta un 45% de lechones nacidos débiles nacidos de madres infectadas (Christianson *et al.*, 1992; Plana Durán *et al.*, 1992; Lager *et al.*, 1995).

Nosotros desconocemos las causas que pueden haber llevado al alto porcentaje de lechones nacidos débiles en el grupo D. Está descrito que a mayor tamaño de la camada, menor es el peso de los individuos que la componen. Sin embargo, en dos hembras de este grupo el tamaño de su camada fue inferior al tamaño medio de todos los animales del experimento (10,75 lechones/camada) y sin embargo presentaron 2 y 3 lechones nacidos débiles. Posiblemente, podríamos atribuirlo a un efecto del VSRRP, pero de ser así no podríamos explicar el porcentaje menor de estos lechones hallado en el grupo B, donde se utilizaron cepas virulentas del virus.

Los pesos al nacimiento fueron estadísticamente similares en todos los grupos. Nuestros resultados están en armonía con los descritos por Mengeling *et al.* (1998a,b), quienes no encontraron evidencia de que la infección por el VSRRP posea un efecto en el peso al nacimiento de los lechones.

Con el peso promedio de las camadas al destete, mediante el análisis estadístico se pudieron establecer 3 categorías, estando el grupo D (ALL183) en la posición intermedia entre los máximos resultados obtenidos en los grupos A y C contra el bajísimo peso medio al destete alcanzado en el grupo control infectado. Nosotros creemos que en el grupo B, la infección por el VSRRP desempeñó un papel importante en los pesos obtenidos en este momento.

A excepción de lo sucedido con el grupo D, nuestros datos concuerdan con Gorcyca *et al.* (1997b) que no hallaron diferencias en el peso a los 14 días de edad entre los

lechones nacidos de madres inoculadas con la cepa de la vacuna RespPRRS y los de madres sin inocular. Similares resultados fueron descritos por Mengeling *et al.* (1998), quienes no hallaron diferencias en el peso tanto al nacimiento como a los 21 días de vida entre lechones nacidos de madres que recibieron la vacuna americana y los controles, pero sí con las camadas cuyas madres recibieron las cepas virulentas.

No obstante, la ganancia de peso en los grupos C y D (cepas atenuadas del VSRRP) fue estadísticamente similar, a pesar de la diferencia estadística marcada entre el grupo D y A. Lo que se traduce en que la vacuna AmervacPRRS® se comporta igual que el control no infectado en cuanto al incremento de peso en los lechones a los 21 días de vida. No así la vacuna Pyrsvac183®, si bien en ambos casos existen enormes diferencias respecto al control infectado.

Dentro del grupo control infectado, las dos camadas que obtuvieron mejores rendimientos de peso al destete correspondieron a las hembras número 7 y 8, que además presentaron un mayor porcentaje de supervivencia a los 21 días (100% y 83%, respectivamente). Resulta particularmente sorprendente, lo sucedido con la camada de ésta última cerda, ya que estos lechones presentaron graves signos de disfunción respiratoria, y sin embargo, el porcentaje animales destetados fue de un 83,3%. Debemos recordar que en todas las camadas de este grupo los porcentajes de lechones con el VSRRP fueron similares o cercano al 100%.

Mengeling *et al.* (1998a), describieron una situación similar, en donde dos camadas cuyas madres estuvieron inoculadas con el VSRRP consiguieron mejores pesos al destete que los lechones del grupo control. Esto aparentemente sugeriría, que ciertas cepas del VSRRP podrían tener un efecto positivo sobre la ganancia de peso, sin embargo estos autores descartan tal posibilidad atribuyendo lo sucedido al reducido número de la camada lo que favoreció un fácil acceso a dosis superiores de leche que hizo que alcanzaran máximas ganancias de peso. Coincidentemente, en estos grupos se destetó el menor porcentaje de lechones, y sumado a ello, una de esas camadas fue la que presentó los signos respiratorios más severos.

Nosotros creemos que tanto el porcentaje de supervivencia como el peso al destete en las camadas de las hembras número 7 y 8 pueden atribuirse a las buenas condiciones medioambientales donde estuvieron los animales. Puesto que disponían de un establo individual para la cerda y su camada, con bastante espacio, cama de paja, así como de una

temperatura confortable. De esta forma, coincidimos con Mengeling *et al.* (1998a), en que si este tipo de lechones estuvieran en un ambiente más competitivo, como en las condiciones normales de producción, tal vez los porcentajes de supervivencia serían notablemente inferiores.

Los porcentajes de lechones destetados en los grupos C y D son similares a los obtenidos en el grupo A, sugiriendo que las cepas vacunales pueden tener poco o ningún efecto sobre la supervivencia de los lechones hasta el momento del destete. Al contrario de lo sucedido en el grupo B, donde el porcentaje de lechones destetados fue significativamente inferior. Estos datos coinciden con los publicados por Gorcyca *et al.* (1997b) en sus estudios de seguridad de la vacuna RespPRRS/Repro<sup>®</sup>, que destetaron un 100%; 83% y 0% en los grupos de cerdas control, inoculadas con la cepa vacunal y cepa virulenta del PRRS, respectivamente.

#### **4.1.2.4 Infección transplacentaria**

Las cepas vacunales utilizadas en nuestro estudio produjeron infecciones transplacentarias, aunque en un grado significativamente inferior al registrado por las cepas virulentas. Aparentemente habría un mejor comportamiento de la cepa VP046bis (grupo C), con un 18,6% de lechones con aislamiento vírico positivo, en relación al 31,8% obtenido en el grupo que recibió la cepa ALL183 (grupo D). Además el número de camadas infectadas fue inferior en el grupo C (2 camadas) que en el B y D (4 y 3 camadas, respectivamente). Estos datos difieren de los obtenidos por Mengeling *et al.* (1998a), donde todas las camadas nacidas de las madres que recibieron la cepa vacunal presentaron al menos un individuo infectado. Asimismo, divergen de los resultados obtenidos por Llanos y *et al.* (2000) con la vacuna de los laboratorios Syva, donde en las pruebas de seguridad no se detectaron lechones nacidos positivos al VSRRP de madres que recibieron la cepa vacunal.

El porcentaje de animales virémicos en el día 0 (inferior al 5,5%) en los grupos C y D discrepa del 43% indicado por Mengeling *et al.* (1998a) en el grupo inoculado con la cepa de la vacuna RespPRRS<sup>®</sup>. Entre los grupos que recibieron las cepas virulentas, los citados autores detectaron entre un 44% y 90% de viremias en el día 0, dependiendo de la cepa utilizada.

Un dato curioso, es que los porcentajes de aislamientos positivos a partir del suero aumentan conforme pasa el tiempo, en los grupos B y D, siendo particularmente importante en éste último grupo donde se llega a un 17,9% de lechones virémicos a los 21 días de edad. Por el contrario, la viremia desaparece entre los lechones del grupo C. Sin embargo, cuando se incluyen las muestras de órganos y de MAP, los animales positivos aumentan, tanto en el grupo C como en el D, aunque siempre inferior al 40% de positivos en cada grupo.

Lo primero podría explicarse, al menos, en dos formas diferentes: 1) en las muestras de los primeros días, posiblemente las  $DI_{50}CT$  serían menores, lo que haría que nuestro sistema de captación fuera incapaz de detectarlas, a pesar de trabajar con lotes de MAP, cuya sensibilidad permitió detectar 100  $DI_{50}CT/ml$  en al menos el 0% de las repeticiones, 2) que ocurriese una diseminación del virus desde los cerdos infectados a cerdos convivientes, en teoría sin el virus. Por tanto, nosotros no podemos asegurar si hubo transmisión horizontal del virus o simplemente obedece a una cuestión de sensibilidad para captar los animales infectados con bajas  $DI_{50}CT$  en suero.

Estos resultados coinciden con los de Mengeling *et al.* (1998a), en cuyos trabajos el porcentaje de lechones con aislamiento vírico positivo aumenta hacia los 21 días de vida. No obstante existe discrepancia en cuanto al porcentaje de lechones positivos en el grupo de las cerdas que recibieron la cepa vacunal. Estos autores indican porcentajes del orden del 43% y 81% de lechones virémicos en el día 0 y 21, respectivamente. Estas diferencias se pueden deber a una serie de factores:

1) la cepa de virus empleada. Ellos utilizan una cepa americana, que puede presentar diferencias en cuanto a la virulencia, si bien todas son atenuadas;

2) que el virus de la vacuna americana esté más adaptado a la línea celular utilizada como soporte para el aislamiento que en el caso de las cepas vacunales utilizadas por nosotros. En este sentido, como ya se mencionó en la discusión de la viremia en las hembras, todas las muestras de los grupos C y D (cepas atenuadas) fueron negativas en cultivos de MAP, mientras que la mayoría de ellas fueron positivas en la línea celular MARC-145. Por tanto, para poder realizar una comparación bajo similares condiciones, habría que intentar el aislamiento de nuestras muestras en la línea celular donde las cepas vacunales fueron adaptadas.

Del análisis conjunto de todos los datos obtenidos en este experimento podemos decir:

- que los animales que recibieron las cepas virulentas, en su mayoría, presentaron algún signo clínico después de la inoculación (a excepción de la cerda número 5, que tuvo una elevación de la temperatura rectal sin llegar a ser pirexia), con una disminución del rendimiento productivo (aumento del número de lechones nacidos muertos, momias de tipo II y disminución en algunos casos del número de destetados), con infecciones transplacentarias y lechones nacidos infectados

- que ninguna de las hembras del grupo C y D presentaron signos clínicos (excepción las cerdas número 10; 13 y 16 que tuvieron una leucopenia transitoria), los parámetros productivos se acercaron más a los del grupo control, no obstante se produjeron infecciones transplacentarias con el nacimiento de lechones virémicos.



#### 4.2. Estudio de la eficacia en hembras gestantes de las vacunas frente al SRRP.

#### **4.2.1. Resultados**

##### **4.2.1. Signos clínicos**

###### **i. Período correspondiente a la vacunación**

Después de la vacunación, no se observaron reacciones locales o generales en los animales de los grupos C y D. Ninguno de ellos mostró signos clínicos asociados a la infección por el VSRP. Tampoco presentaron trastornos en el apetito, comiendo normalmente la ración diaria de pienso.

En los animales del grupo E, no se observaron reacciones locales o generales después de la administración de la primera dosis de vacuna. No obstante, después de la segunda dosis se notó una ligera reacción en el punto de inoculación de las cerdas número 19; 20 y 22, consistente en un enrojecimiento y una leve tumefacción. En ningún caso se presentó inapetencia, decaimiento o cualquier otro signo de enfermedad.

Las cerdas de los grupos controles (A y B) permanecieron normales durante el período correspondiente a la vacunación.

Las temperaturas rectales tomadas en los individuos de los grupos que recibieron las vacunas (B, C y D) no superaron los 39,7°C, temperatura por encima de la cual establecimos que se podía considerar que el animal tenía fiebre (Tabla 11). Las únicas excepciones fueron las hembras número 14 y 16 -grupo C-, que tuvieron 39,9°C y 40°C en los días 14 y 15 p.i., respectivamente. No se halló ningún otro signo acompañando la fiebre.

Cuando se compararon estadísticamente las temperaturas medias en las cerdas de los grupos C, D y E en el momento previo a la vacunación (días -10 a 0) con respecto al momento posterior 1 (día 1 a 5 p.v.), 2 (día 6 a 10 p.v.) y 3 (día 11 a 15 p.v.) no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). La figura 11 muestra las temperaturas medias obtenidas para los citados momentos.

Tabla 10. Temperaturas rectales obtenidas en las cerdas de los grupos A, B, C, D y E antes y después de la vacunación contra el VSRP.

Grupo	Nº cerda	DIAS DE TOMA DE MUESTRAS																									
		antes													despu s												
		-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1	37,3	37,5	37,5	37,4	37,0	36,1	35,5	36,8	36,6	36,0	37,6	37,3	37,7	37,4	37,9	37,0	37,5	38,0	37,5	37,0	37,3	37,2	37,6	37,2	37,4	37,0
A	2	39,0	38,6	38,3	37,9	38,3	37,0	38,3	37,0	37,9	37,2	37,1	36,4	36,1	37,9	37,0	38,0	37,3	37,4	37,8	37,4	37,1	38,1	37,9	38,1	37,6	38,0
A	3	38,5	38,0	37,6	37,4	38,6	38,5	38,8	38,9	38,2	38,6	38,8	38,5	38,8	38,6	38,5	38,8	38,7	38,6	39,0	38,7	39,0	38,9	38,8	38,5	38,1	38,4
A	4	38,6	37,1	38,1	38,6	37,7	37,0	36,4	36,8	38,3	38,0	38,5	37,9	38,4	37,6	38,0	37,6	37,8	37,7	37,9	38,6	38,5	38,3	38,0	37,5	38,5	38,1
B	5	39,8	38,8	38,9	38,6	38,9	38,6	38,3	38,2	38,3	38,5	38,4	38,0	38,0	37,8	37,7	36,7	37,0	37,3	37,5	37,8	37,9	38,0	38,5	37,7	37,4	37,8
B	6	38,0	38,2	38,7	39,2	39,1	38,2	38,4	38,7	38,5	37,9	38,0	38,1	35,9	37,6	38,4	38,1	37,2	38,0	38,7	37,8	38,3	38,0	39,5	38,1	37,2	38,0
B	7	38,3	38,6	38,4	38,6	38,8	38,6	38,1	38,6	38,0	38,5	37,6	38,4	37,6	37,0	37,0	37,2	37,8	38,2	38,2	36,9	37,2	36,9	38,3	38,2	37,8	37,5
B	8	38,8	38,9	38,3	38,7	38,5	38,8	38,3	38,3	37,7	38,7	38,1	37,7	38,6	38,7	38,7	38,4	38,4	38,5	38,2	38,1	38,3	38,3	38,3	38,6	38,5	38,1
B	9	39,0	38,9	38,1	38,5	38,3	39,0	38,0	38,0	39,2	38,5	38,9	39,0	39,1	37,9	37,3	37,5	38,6	37,4	37,8	37,8	36,6	36,7	37,9	37,6	37,9	37,8
C	10	38,4	39,2	39,0	39,1	38,9	39,2	39,3	38,3	38,6	38,7	37,9	38,0	39,0	38,7	39,0	38,8	39,3	38,8	39,2	38,8	39,0	38,8	37,9	38,7	39,0	38,8
C	11	38,9	39,1	39,9	38,4	38,5	38,7	38,4	38,3	38,9	38,8	38,3	39,0	38,6	37,7	37,2	38,3	38,4	38,2	38,3	38,2	38,2	38,4	38,9	38,9	38,6	38,8
C	12	39,2	39,1	39,0	38,4	38,8	38,2	37,4	39,1	38,7	38,7	39,0	38,8	38,6	38,5	39,1	38,2	39,1	38,8	38,4	38,6	38,6	38,8	38,8	39,0	38,8	39,2
C	13	39,0	38,8	39,1	38,6	38,8	38,5	38,3	39,4	38,8	38,9	38,8	38,5	38,5	38,2	38,2	38,2	38,9	38,6	38,4	38,7	38,3	38,7	39,2	39,1	39,4	38,8
C	14	37,9	39,1	39,0	38,5	38,9	38,2	37,8	38,2	38,9	39,0	38,5	37,8	37,8	38,1	37,0	37,1	37,2	37,4	38,7	38,5	38,7	38,7	37,6	39,1	39,9	38,7
C	15	38,4	39,2	39,1	39,0	39,4	39,3	39,3	39,0	38,6	38,1	38,6	38,9	39,1	38,1	39,6	38,9	39,4	38,1	39,1	38,4	38,8	39,2	38,2	37,9	38,8	38,6
C	16	39,1	39,0	39,0	38,2	39,1	38,7	38,6	39,2	39,3	39,0	39,0	38,8	38,8	38,7	38,3	38,6	39,1	38,8	39,0	38,6	38,9	39,1	39,1	38,8	39,0	40,0
D	17	39,2	38,7	38,5	38,0	38,9	39,0	38,9	38,9	38,9	39,1	39,5	39,3	39,3	39,5	39,1	39,5	39,3	38,3	39,2	39,1	38,8	38,6	39,2	39,0	39,2	39,2
D	18	38,2	38,9	39,0	38,0	38,9	39,0	38,2	38,9	39,3	39,5	38,7	38,9	38,6	38,2	37,9	37,2	38,4	38,0	39,2	38,7	39,0	38,9	38,3	38,5	38,6	39,0
D	19	38,4	38,6	38,4	38,7	38,7	38,9	39,1	38,5	38,4	38,9	39,1	38,8	38,4	38,7	38,7	38,9	38,9	38,8	38,8	38,8	38,7	38,6	38,7	38,8	38,2	38,9
D	20	38,5	38,2	38,0	38,0	38,5	38,6	38,3	37,7	38,6	38,0	38,5	38,7	38,7	38,1	38,4	37,5	37,6	37,8	38,4	38,0	38,8	38,8	38,8	38,8	38,1	38,2
D	21	38,5	38,8	38,2	38,5	39,0	39,2	38,9	39,3	39,5	39,1	38,8	38,7	39,0	38,9	39,3	39,0	39,2	38,7	39,0	38,8	39,0	39,1	38,9	39,0	38,9	39,1
E	22	39,3	38,4	39,1	39,0	39,1	39,2	39,4	38,4	38,5	38,5	38,9	39,2	39,1	39,2	39,0	39,3	39,1	38,9	39,3	39,0	39,0	39,0	39,2	39,1	39,2	38,9
E	23	38,1	38,4	38,5	38,9	38,4	38,2	38,7	37,8	38,0	37,8	38,3	38,5	38,5	38,5	38,4	38,2	37,8	38,0	38,0	38,4	37,6	39,5	38,2	37,9	38,4	38,2
E	24	38,2	38,0	37,5	38,2	38,3	38,2	38,7	38,5	38,5	37,8	37,7	38,5	37,4	38,2	38,5	38,0	38,2	38,5	38,4	37,8	37,2	37,4	38,5	38,0	38,9	37,5
E	25	38,3	38,2	37,6	37,9	38,4	36,8	38,7	38,7	38,2	38,6	37,9	38,8	37,6	38,4	39,0	38,4	38,3	38,7	38,8	37,8	38,3	38,8	38,5	38,7	38,1	38,5
E	26	38,5	37,9	37,8	38,6	38,7	38,6	38,4	38,4	38,5	38,5	38,2	38,5	38,4	38,5	38,1	38,3	38,5	38,7	39,0	37,0	38,6	38,2	38,1	38,3	38,6	37,7

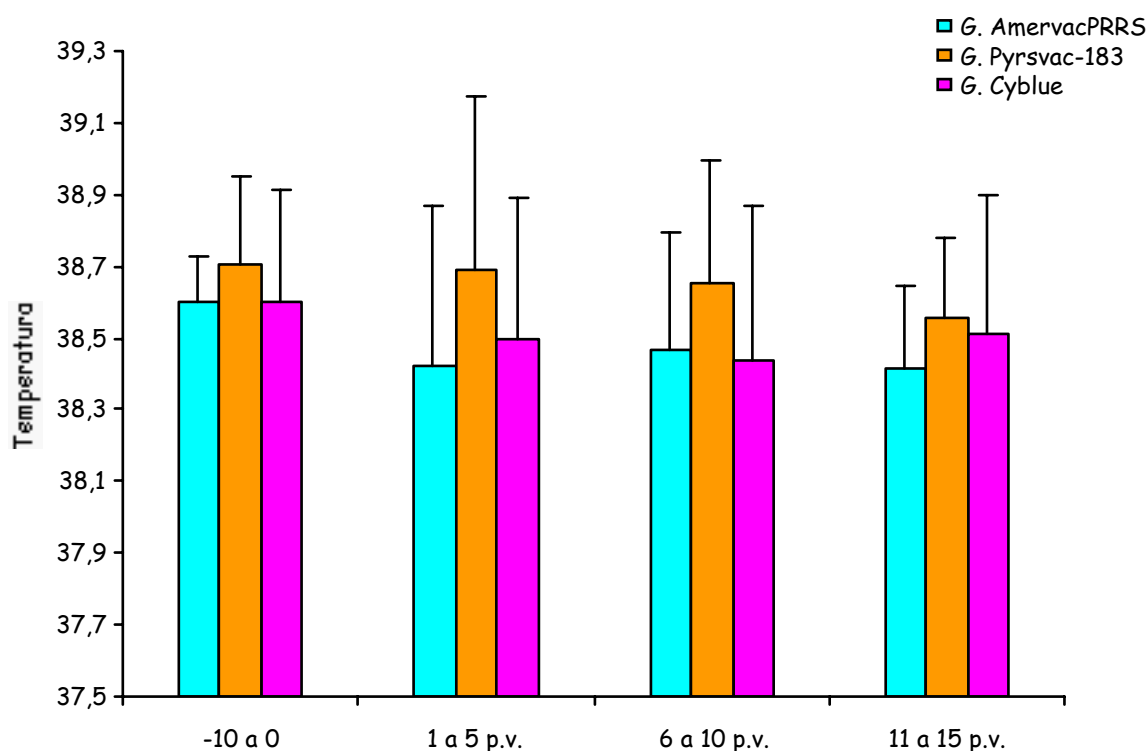


Figura 11. Evolución de la temperatura rectal media de los animales de los grupos C (n=7), D (n=5) y E (n=5), en el período previo y posterior a la vacunación. Las barras representan una desviación estándar.

Durante el período previo y posterior a la vacunación, los análisis hematológicos se llevaron a cabo en el grupo control no vacunado (B), y los grupos que recibieron las vacunas atenuadas AmervacPRRS® y Pyrsvac-183® (grupos C y D, respectivamente). En este caso el grupo B actuó como control, ya que solo recibió la administración de un placebo. Los valores de glóbulos blancos, porcentajes de linfocitos y neutrófilos, obtenidos en cada individuo de estos grupos están expuestos en la tabla 11. En la figura 12 se representan los valores medios de leucocitos en los distintos grupos y días de muestreo.

Los valores de glóbulos blancos en los animales del grupo control se mantuvieron dentro de los límites normales (11.000 a 22.000 células/ $\mu$ l). Los valores promedios para este grupo presentaron el nivel más bajo en los días 12 y 21 p.v. Sin embargo, el valor medio del grupo obtenido en el día 0 no difirió estadísticamente del resto de los momentos ( $p > 0,05$ ). En el primer caso se lo atribuye al descenso en el número de leucocitos de la

hembra número 6, mientras que en el día 21 p.v., la mayoría de los animales disminuyeron el número de estas células.

En el grupo C (AmervacPRRS®) todos los individuos los recuentos de leucocitos fueron dentro de los límites normales, a excepción de las hembras número 13 y 14. Estos animales presentaron leucopenia en los días 3 y 5 p.v., respectivamente. Los valores medios de glóbulos blancos en este grupo disminuyeron un 21,4% en el día 3 p.v. ( $p < 0,05$ ) y un 19,9% en el día 3 y 5 p.v. ( $p = 0,0638$ ), respecto del día 0.

Los animales del grupo D (Pyrsvac-183®) estuvieron dentro del rango normal de leucocitos, salvo la hembra número 20 que en el día 7 p.v. tuvo un recuento de 10.900 leucocitos/ $\mu$ l. Al igual que en el grupo anterior, los valores promedio del grupo disminuyeron en los días 3 y 5 p.v., pero con mayor intensidad (28,3% y 32%, respectivamente), resultando estadísticamente diferentes del valor medio del grupo en el día 0 ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).

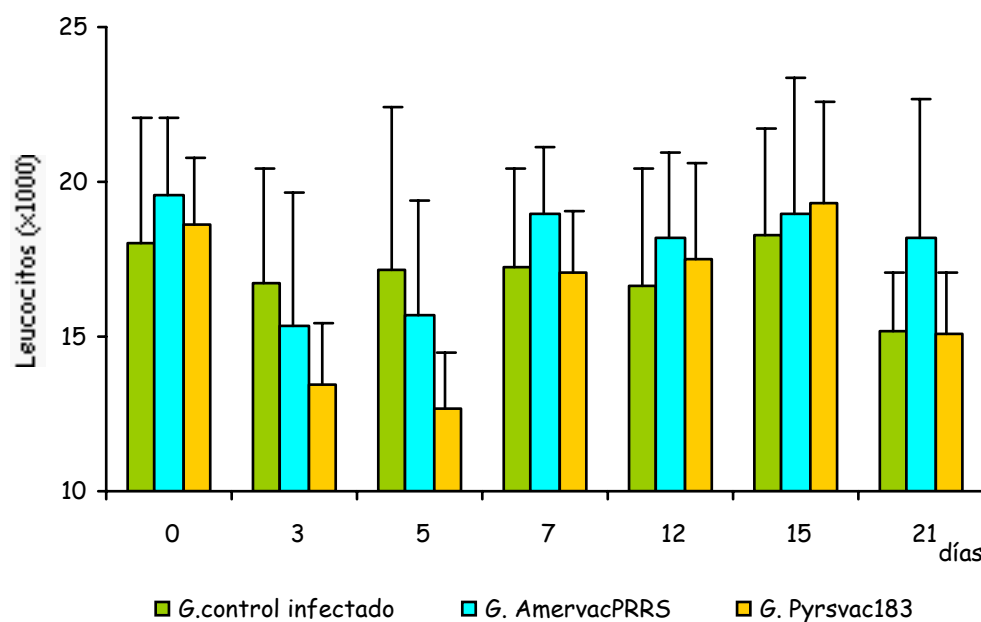


Figura 12. Valores medios de glóbulos blancos en las muestras correspondientes a los momentos previo y posteriores a la vacunación de los grupos B, C y D. Las barras representan una desviación estándar.

Tabla 11. Valores de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en las hembras de los grupos B, C y D, correspondientes al período de vacunación.

Nº		D'as de obtenci—n de las muestras																							
Grupo	Cerdas	Leucocitos (x1000)								% linfocitos								% neutr—filos							
		0	3	5	7	12	15	21	0	3	5	7	12	15	21	0	3	5	7	12	15	21			
B	5	18,5	12,8	21,8	19,6	16,5	22,6	15,5	36	32	36	28	52	43	43	56	67	62	60	47	52	53			
B	6	20,9	19,7	12,2	17,6	12,9	16,5	14,6	28	36	36	39	36	48	24	67	60	60	56	58	51	75			
B	7	12,4	15	12,8	13,7	12,1	14,0	14,0	22	52	36	40	36	44	40	67	44	60	59	55	48	48			
B	8	22,6	21,6	23,7	21,0	20,5	20,9	18,3	38	28	24	48	28	52	36	60	67	64	48	67	44	56			
B	9	15,6	15,0	15,1	14,5	12,8	17,2	13,5	30	24	32	24	43	36	36	68	75	64	68	59	68	56			
C	10	17,5	19,2	15,2	20,8	21,8	25,0	18,2	47	39	36	40	36	32	32	49	45	52	52	63	60	64			
C	11	17,6	12,4	12,7	15,3	18,5	19,7	16,4	24	28	28	32	20	42	43	72	71	71	60	79	48	55			
C	12	23,6	13,1	17,3	18,0	16,2	21,8	14,9	28	36	32	32	48	48	32	68	57	60	56	48	48	56			
C	13	18,2	8,5	9,2	17,3	13,4	11,0	11,4	27	52	30	40	32	44	60	72	40	66	59	67	44	39			
C	14	22,6	17,3	19,1	20,6	18,8	19,6	20,4	27	24	28	44	56	40	32	71	75	56	52	43	56	60			
C	15	19,1	20,7	16,8	19,4	20,5	16,5	24,5	32	32	28	44	52	48	56	67	64	68	48	40	44	36			
C	16	18,4	16,3	19,7	21,3	18,1	19,0	21,7	31	24	28	32	36	34	32	63	75	60	60	48	62	61			
D	17	18,2	14,2	12,5	18,2	22,6	20,8	13,4	26	24	48	32	40	32	32	66	72	36	55	55	52	55			
D	18	15,6	16,5	14,3	14,8	16,8	15,0	17,8	28	39	44	36	44	43	48	56	57	44	54	44	52	48			
D	19	21,5	12,7	14,7	19,9	17,8	19,7	16,1	25	36	32	24	48	22	32	72	60	67	68	48	67	63			
D	20	19,4	12,2	10,9	16,4	15,3	17,4	13,0	19	45	44	39	60	46	48	63	36	55	57	32	44	51			
D	21	18,6	11,5	11,0	15,9	15,0	23,6	15,1	36	32	36	39	48	40	40	64	67	61	36	48	52	48			

En la fórmula leucocitaria relativa, los porcentajes medios de neutrófilos en los grupos B y C varían muy poco a lo largo del período de estudio. En el grupo D, se observa una fuerte disminución (30% en relación al día 0) en los valores medios de estas células en el día 12 p.i. (figura 13). El análisis estadístico de estos datos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios totales en los días 5, 7, 12, 15 y 21 en relación al día 0 ( $p < 0,001$ ). Estas diferencias se atribuyen a que la media de los grupos evolucionó con una tendencia decreciente a través del tiempo, de una forma similar en todos los grupos ( $p > 0,05$ ). El análisis de los distintos momentos en relación al día 0, para cada grupo, no arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Analizando los animales de forma individual se observó un mayor número de cerdas que presentaron disminuciones superiores al 30% en los grupos que recibieron las VA. AmervacPRRS® (cerda número 11 en el día 15 p.v; cerda 13 en los días 3, 15 y 21 p.v.; cerda 14 en el día 12 p.v y la número 15 en los días 12,15 y 21 p.v) y Pysrvac-183® (cerda 17, 19 y 21 en el día 5, 12 y 7 p.v., respectivamente, y la cerda número 20 en los días 3, 12 y 15 p.v.), respecto del grupo B donde solamente fue descrita en el animal número 7 en el día 3 p.v.

Por su parte, los linfocitos presentaron un comportamiento similar, pero en sentido contrario a los neutrófilos (figura 13). El análisis estadístico no evidenció interacción entre los grupos a través del tiempo ( $p > 0,05$ ), indicando que todos los grupos siguieron un comportamiento parecido. Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el valor promedio del día 0 y los posteriores, considerando cada grupo, ( $p > 0,05$ ).

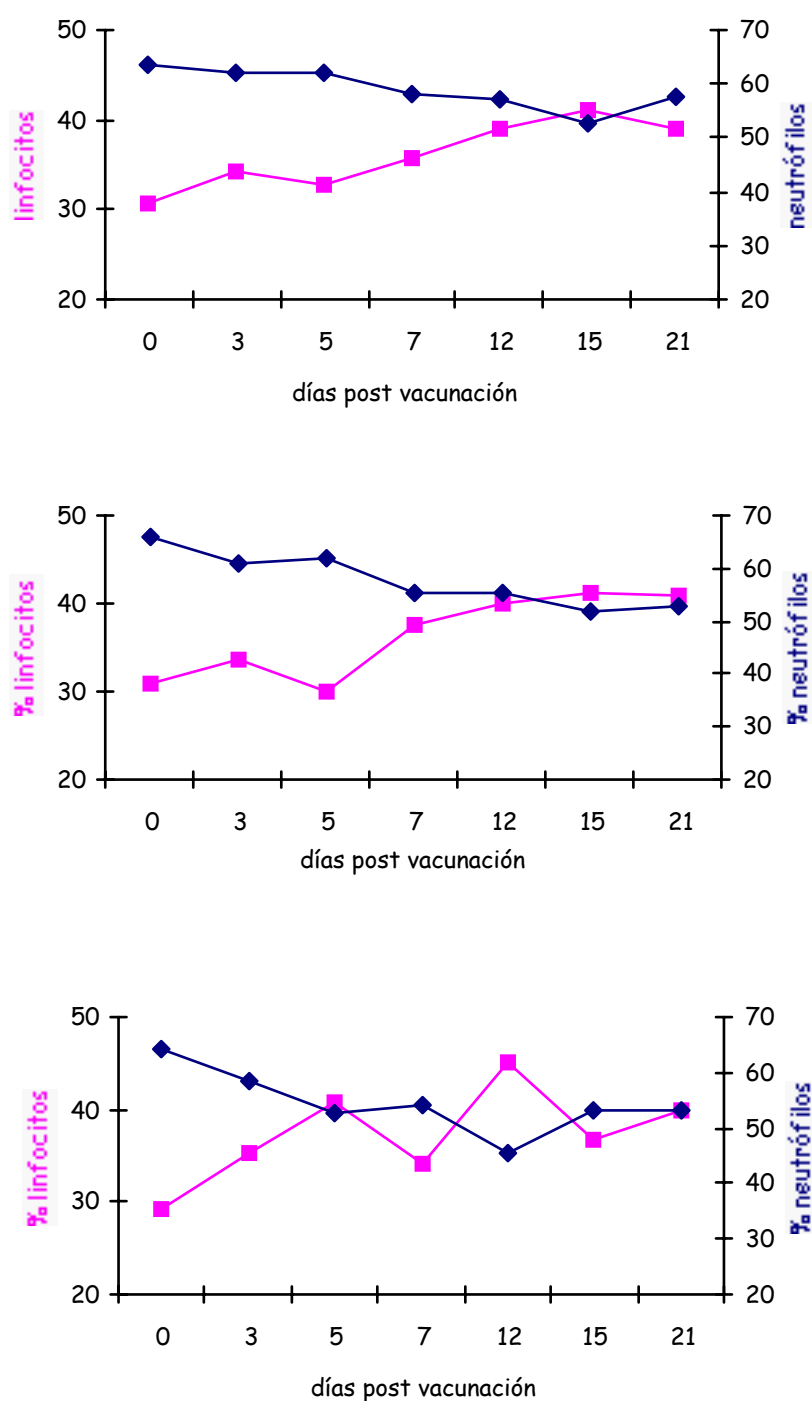


Figura 13. Distribución del porcentaje de linfocitos y de neutrófilos en el período correspondiente a la vacunación de los grupos B, C y D.



## **ii. Período correspondiente al desafío**

En los animales del grupo control (A), las temperaturas rectales registradas antes y después de la inoculación intranasal con sobrenadante de cultivo de MAP en el día 90 de gestación, se mantuvieron dentro del rango de la normalidad (Tabla 12). Asimismo, estos animales permanecieron en buenas condiciones de salud durante todo el período.

En el grupo no vacunado e infectado (B), tres animales mostraron signos de enfermedad después de la inoculación con el VPRRS. Como se observa en la tabla 13, dichas cerdas padecieron anorexia, postración, pigmentación en piel y disnea. En la figura 14 se muestra el aspecto de las lesiones en piel observadas. En la cerda número 6, en el día 4 p.i., se observaron manchas color rojo-violeta en la parte inferior del pabellón auricular derecho de un diámetro de 2,5 cm aproximadamente, las que desaparecieron después de unas horas. Este signo fue acompañado de falta de apetito. Esta misma cerda estuvo inapetente en los días 8, 9, 10 y 11 p.i., coincidiendo con una lesión producida en su mano. La cerda número 7 mostró lesiones en piel en el día 3 p.i., ubicadas en el extremo inferior del pabellón auricular izquierdo, consistentes en manchas rojo-violeta de 3 cm de diámetro, aproximadamente, que desaparecieron en el mismo día. Durante dicha jornada, el animal permaneció postrado y con menor apetito. La disminución del apetito se prolongó hasta el día 21 p.i. En los días 12, 13 y 14 p.i., nuevamente presentó coloración anormal en la piel de ambos pabellones auriculares, siendo en esta oportunidad difusas y de color lila. Esta misma cerda evidenció disnea entre los días 9 y 14 p.i., iniciándose con una respiración superficial que rápidamente pasó a ser de carácter torácico llegando a adoptar la posición de "perro sentado". La temperatura rectal alcanzó valores considerados febriles en los días 7, 8, 9, 10 y 13 p.i., siendo el valor más alto 40,3 °C, registrado en el día 13 p.i. La cerda número 9 estuvo decaída durante los días 9 y 10 p.i., permaneciendo postrada. Asimismo en el día 10 p.i. mostró dificultad respiratoria leve y un aumento de la secreción nasal. En los animales número 5 y 8 no se observaron signos de enfermedad. Las temperaturas rectales, salvo en la cerda número 7, permanecieron dentro de los límites de la normalidad.

En el grupo C (vacuna AmervacPRRS®), los animales número 14 y 16 se mostraron inapetentes y poco activos entre los días 2 y 5 p.i. En las restantes cerdas no se apreció ningún signo de enfermedad. Solamente en un animal se observó temperatura febril, correspondió a la hembra número 10 en el día 3 p.i., que marcó 40,2°C.

Las cerdas del grupo D (vacuna Pysvac-183<sup>®</sup>) se mantuvieron normales durante este período, a excepción de la cerda número 20. Este animal presentó temperatura febril en el día 5 p.i. y disminución del apetito entre los días 3 y 6 p.i.

En el grupo E (Cyblue<sup>®</sup>), la cerda número 22 manifestó una disminución en el apetito, entre los días 3 y 4 p.i.. Además en el segundo día después de la inoculación con el virus mostró una coloración cianótica en el borde de ambos pabellones auriculares. La cerda número 26 tuvo la conjuntiva ocular de ambos ojos enrojecida durante el día 9 p.i. El resto de los animales de este grupo no evidenciaron alteraciones patológicas visibles.

Tabla 12. Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos estudiados en el período correspondiente a la inoculación experimental con el VSRPP.

D'a	N mero de las cerdas																									
	Grupo A				Grupo B					Grupo C						Grupo D					Grupo E					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
-10	38,5	38,3	38,8	39,0	38,6	38,1	38,1	38,2	38,5	38,5	38,2	38,4	38,6	38,5	38,3	38,5	38,2	37,8	37,9	38,0	37,8	37,9	38,0	38,0	37,5	37,3
-9	38,5	38,5	39,0	39,2	38,3	38,5	38,2	38,0	37,9	38,7	38,3	38,0	38,5	38,4	38,3	38,4	38,7	38,2	38,1	37,9	38,3	37,9	38,0	38,1	37,5	37,4
-8	38,5	38,2	38,6	38,9	37,9	38,0	38,5	38,3	38,2	38,5	38,5	38,6	38,5	38,6	38,3	38,3	38,0	38,0	38,0	38,6	38,3	37,9	38,0	37,8	37,5	38,3
-7	38,7	38,0	38,7	38,0	38,3	38,1	38,0	38,5	38,4	38,7	38,6	38,4	38,2	38,5	38,3	38,4	38,8	38,6	38,0	38,7	38,2	37,6	37,8	38,0	38,4	38,0
-6	38,4	38,9	37,9	38,5	38,1	37,9	38,1	38,4	38,4	38,7	38,2	38,4	38,1	38,6	38,4	38,4	38,1	38,1	38,3	38,3	38,5	37,9	37,6	38,2	38,3	38,4
-5	38,2	38,4	37,9	38,2	37,8	38,0	38,1	38,2	38,4	38,4	38,5	38,5	38,3	38,3	38,5	38,3	38,3	38,2	38,0	37,9	38,5	38,2	37,3	37,7	38,2	38,3
-4	38,4	38,5	38,6	38,1	38,6	38,1	38,0	38,4	38,4	38,7	38,2	38,3	37,8	38,3	38,1	38,3	38,2	38,1	38,2	38,7	38,7	37,4	38,4	38,2	38,3	38,5
-3	37,4	38,0	37,9	37,3	37,5	37,7	38,0	38,3	38,2	38,4	38,2	38,2	38,0	38,3	38,6	38,2	38,6	38,5	37,8	37,9	38,2	37,7	38,7	37,9	38,2	38,3
-2	38,8	38,8	38,2	38,7	38,1	38,0	38,0	38,2	38,3	38,6	38,2	38,1	38,4	38,2	38,3	38,7	38,0	38,1	37,4	38,4	37,9	38,0	37,8	38,0	38,1	38,1
-1	38,2	38,2	38,0	38,0	38,2	38,2	38,2	38,1	38,4	38,9	38,3	38,4	38,2	38,7	38,8	38,2	38,4	38,4	37,9	37,7	38,6	37,7	37,7	38,1	38,2	37,9
Inoculaci—n	38,8	38,0	38,1	38,8	38,0	38,7	38,4	38,2	38,2	38,5	38,2	38,7	38,1	38,2	38,3	38,0	38,5	38,1	37,9	38,3	38,0	38,2	38,2	38,6	38,1	38,0
1	37,9	37,8	37,9	37,8	38,8	39,0	37,3	38,1	38,9	38,6	38,8	38,5	38,2	39,5	38,1	39,6	38,4	38,7	37,9	38,7	38,1	38,7	38,1	38,6	38,5	37,7
2	37,4	38,3	38,6	38,7	38,4	39,2	38,6	38,5	38,7	38,9	39,3	38,6	39,1	37,7	38,2	37,6	38,9	38,4	38,8	38,1	37,7	38,7	37,9	38,3	38,1	38,0
3	38,3	38,2	38,5	38,6	38,5	38,6	38,5	38,8	37,7	40,2	37,5	38,1	38,5	39,2	38,2	38,9	39,3	39,0	37,9	38,7	38,1	38,3	39,0	38,6	38,1	38,2
4	37,6	38,1	37,4	38,6	38,3	38,1	38,6	39,2	38,2	38,2	38,3	38,1	39,6	38,9	38,6	39,3	39,5	38,5	38,8	38,1	37,6	38,3	37,4	38,0	38,2	38,4
5	37,8	38,0	36,7	37,8	38,4	37,7	38,2	38,4	38,4	39,3	38,4	38,6	37,5	37,9	38,2	37,7	38,2	38,0	37,9	38,5	39,0	38,4	38,3	38,9	38,5	38,3
6	38,2	37,7	37,5	38,0	38,7	38,0	38,7	38,2	38,5	38,3	37,9	37,3	38,0	38,1	38,5	37,7	38,3	38,0	38,9	40,0	38,7	38,2	37,8	38,3	38,4	38,3
7	37,5	36,9	36,8	37,5	38,2	38,8	40,2	38,5	38,8	38,4	38,1	38,2	38,2	38,2	38,3	38,6	38,1	38,2	38,2	38,6	38,2	38,2	38,2	38,8	38,3	38,4
8	38,6	37,9	38,4	37,6	38,5	39,6	40,1	38,5	39,2	38,3	38,5	38,3	38,2	38,0	38,4	37,9	38,0	37,7	38,1	37,7	38,3	38,3	39,2	38,3	38,4	38,4
9	38,1	38,0	38,1	37,8	38,5	38,2	39,9	38,3	38,8	38,5	38,2	38,5	38,0	37,8	38,1	37,7	38,0	37,3	38,1	38,3	38,3	38,4	37,7	38,3	38,4	38,3
10	38,2	37,8	38,1	38,1	38,5	37,8	40,3	38,6	38,5	38,5	38,2	37,8	38,3	38,0	38,0	37,3	37,8	38,2	38,1	38,4	38,1	38,1	37,3	38,3	38,0	38,2
11	38,7	36,1	37,9	37,4	38,2	37,5	39,2	38,8	38,4	38,1	37,5	38,0	38,2	37,4	38,2	37,9	37,9	38,2	38,3	38,2	38,0	38,3	37,6	37,6	38,2	38,3
12	37,5	37,0	38,1	38,0	38,0	37,8	38,7	38,5	38,9	38,5	38,6	38,6	38,3	38,1	38,5	38,6	37,7	37,7	38,3	38,2	37,8	38,4	37,6	37,5	38,6	38,7
13	37,0	37,6	38,1	38,1	37,9	38,0	39,7	38,0	38,3	38,5	38,1	38,7	38,1	38,2	38,3	37,3	37,7	37,6	38,3	38,3	38,0	38,2	37,7	38,3	38,1	38,1
14	38,4	38,3	38,4	38,4	38,1	37,8	38,2	38,2	38,4	38,3	38,4	38,2	38,1	38,0	38,1	38,1	37,8	37,8	37,9	38,3	38,0	38,4	37,6	37,9	38,4	38,1
15	38,3	38,0	37,9	38,1	38,0	38,1	38,0	38,0	38,2	37,3	37,9	38,1	37,9	37,9	38,2	38,2	37,9	37,8	37,7	38,0	38,1	38,5	37,9	38,2	38,4	37,9
16	39,0	38,6	38,6	38,0	38,3	37,8	37,9	38,6	38,3	38,4	38,2	38,2	38,0	38,3	38,1	37,9	37,9	37,7	38,2	38,1	38,0	38,9	38,2	38,5	38,2	38,3
17	38,8	38,0	37,9	37,5	38,2	37,9	38,3	38,7	38,1	38,4	38,0	38,4	38,0	38,3	38,1	37,8	38,0	38,2	38,0	38,4	38,2	38,4	38,6	38,1	38,3	38,2
18	38,8	38,0	37,9	37,5	38,4	38,4	38,3	38,8	38,1	38,8	37,9	38,0	38,3	38,0	38,4	38,0	38,1	38,3	37,9	38,5	38,2	38,1	38,6	38,3	38,7	38,5
19	37,9	38,1	38,0	37,5	38,4	38,1	38,5	38,4	37,9	38,4	38,5	38,1	38,4	38,3	38,1	38,1	38,3	37,7	37,6	38,0	38,0	37,9	39,4	38,3	38,1	38,4
20	38,5	38,2	38,1	38,1	38,1	37,9	38,7	38,3	38,3	39,0	38,1	38,1	38,3	37,9	38,0	38,1	37,4	37,5	38,8	39,1	38,0	37,9	38,9	38,1	38,5	38,1

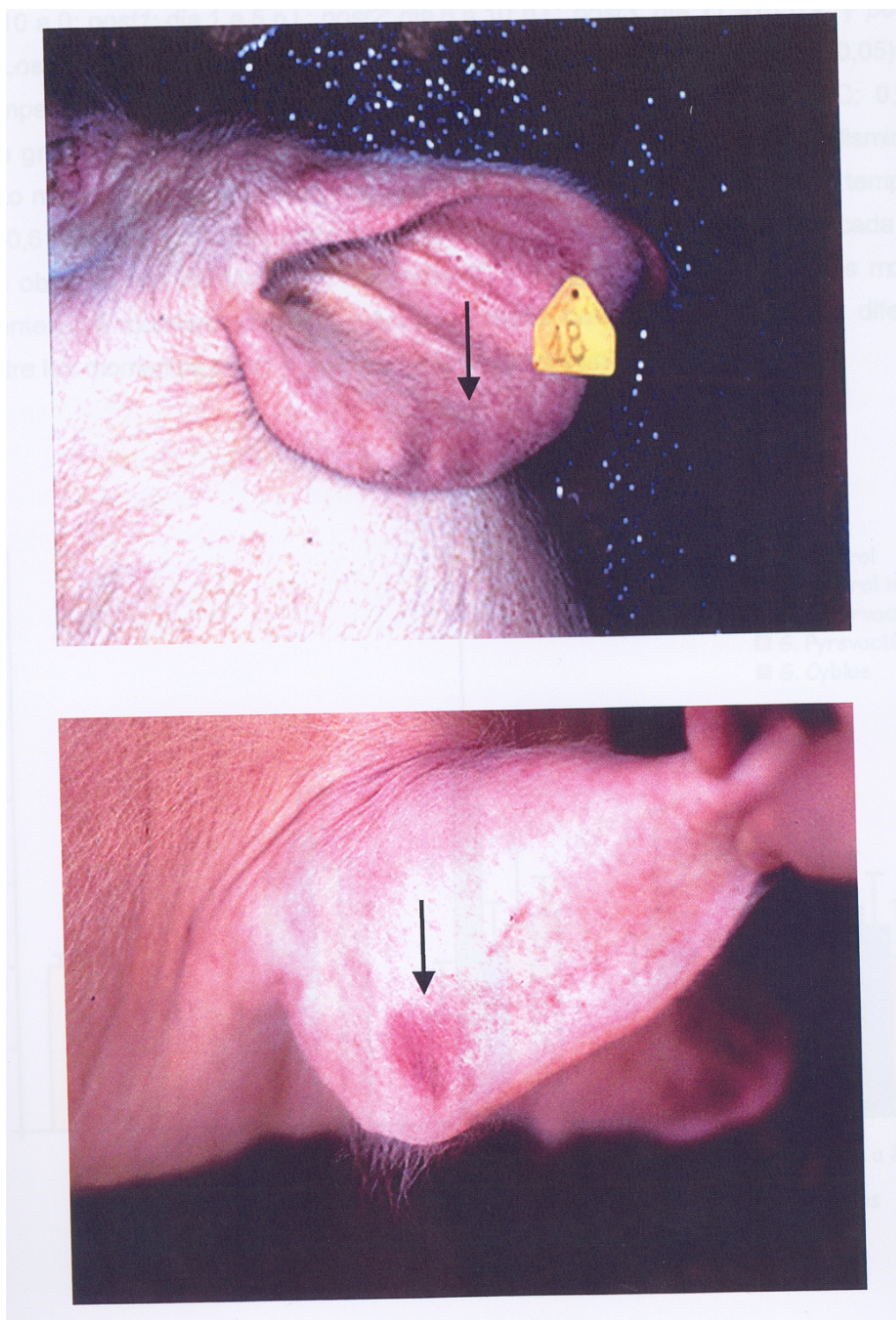
Tabla 13. Signos clínicos observados en las cerdas después de la inoculación con el VSRRP en el día 90 de gestación. Solamente están incluidos los animales que manifestaron algún signo clínico asociado a la infección con el virus.

Grupo	Nº <sup>1</sup> cerda	Días post inoculación																						Puntuación Clínica <sup>2</sup>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
B	6			A <sup>1</sup>	A LC				A <sup>1</sup>	A <sup>1</sup>	A <sup>1</sup>	A <sup>1</sup>												0,15
B	7			A	A LC	A	A	A	A	L	L	L	L	L	L	L	L	A	A	A	A	A		2,5
										RS	RR	RT	RT	RT	RT									
B	9										RS													0,3
										L	L													
												DN												
C	14		A	A	A	A																		0,2
C	16		A	A	A	A																		0,2
D	20			A	A	A	A																	0,2
E	22			A	A																			0,1

1: Signos clínicos: A: anorexia, L: Letargia, RS: respiración superficial, RR: respiración rápida, RT: respiración trabajosa, LC: lesiones cutáneas, DN: descarga nasal aumentada

2: la puntuación final se obtiene ponderando el valor asignado a cada signo (ver en el apartado Materiales y Métodos) por el número de días que estuvo presente.

\* Estos signos no se tuvieron en cuenta para la puntuación clínica, dado que presumiblemente responden a una lesión ocasionada en la mano del animal.



*Figura 14. Lesiones eritematosas en el pabellón auricular de cerdas afectadas por el VSRRP.*

Para el análisis estadístico, las temperaturas rectales se agruparon en 5 momentos: *previo*: días -10 a 0; *post1*: día 1 a 5 p.i.; *post2*: día 6 a 10 p.i.; *post3*: día 11 a 15 p.v. y *post4*: día 16 a 20 p.v. Los grupos presentaron una evolución distinta a través del tiempo ( $p > 0,05$ ) (figura 15). Las temperaturas medias aumentaron en el momento *post1*, 0,26°C; 0,19°C; 0,24°C y 0,32°C en los grupos B, C, D y E respectivamente, en tanto que en el grupo A disminuyeron levemente. Lo más llamativo sucede en el grupo B, en el momento *post2*, donde la temperatura media sube 0,61°C. En las comparaciones estadísticas realizadas dentro de cada grupo, solamente se observaron diferencias en los grupos C y E. En el grupo C todos los momentos fueron diferentes del momento previo ( $p < 0,05$ ), mientras que en el grupo E las diferencias existieron entre los momentos *post1* y *post2* en relación al previo ( $p < 0,05$ ).

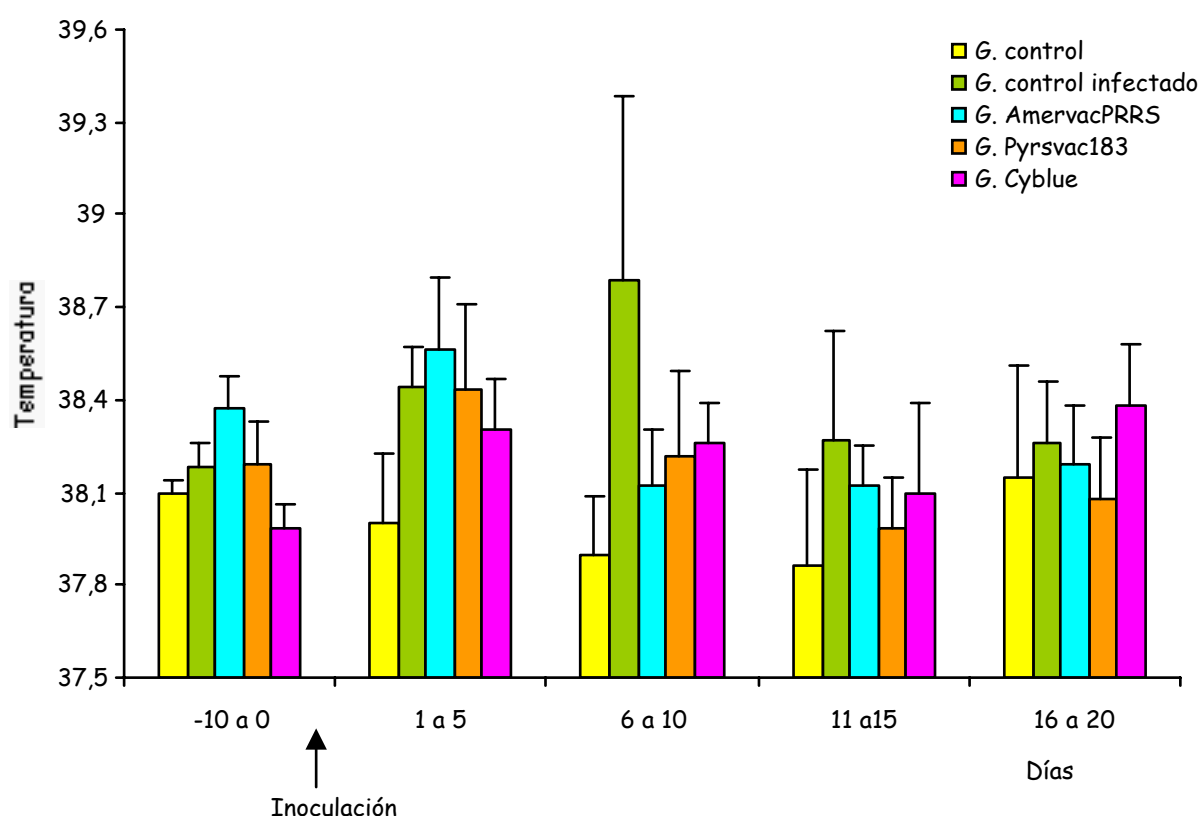


Figura 15. Evolución temperatura en el tiempo de la rectal media en los grupos A, B, C, D y E. Las barras representan una desviación estándar.

En el hemograma, el valor medio de glóbulos blancos disminuyó en los cuatro grupos que recibieron el VSRRP, en los días 3 y 5 p.i., fundamentalmente (figura 16). Los valores medios del grupo A no presentaron diferencias estadísticamente significativas a través del tiempo de estudio ( $p > 0,05$ ). Por su parte, los grupos B, C y E presentaron diferencias estadísticas entre los valores medios del día 0 y los del día 3 y 5 p.v ( $p < 0,05$ ). En el grupo D se observaron diferencias entre el número promedio de leucocitos a través del tiempo ( $p < 0,01$ ), no obstante ninguno de ellos difirió con respecto al día 0.

Al analizar los valores individuales, se observó leucopenia en 4 cerdas del grupo B, principalmente entre los días 3 y 5 p.i., aunque en la cerda número 9 se prolongó hasta el día 9 p.i. En el grupo C hubo 4 animales con leucopenia, en el día 3 p.i., fundamentalmente, mientras que en el grupo D solamente la hembra número 20 tuvo leucopenia -día 3 p.i.-. En el grupo E, la mayoría de los individuos presentaron leucopenia persistiendo en algunos casos hasta el día 12 p.i.. La hembra número 23 mantuvo los niveles de leucocitos dentro del rango considerado normal.

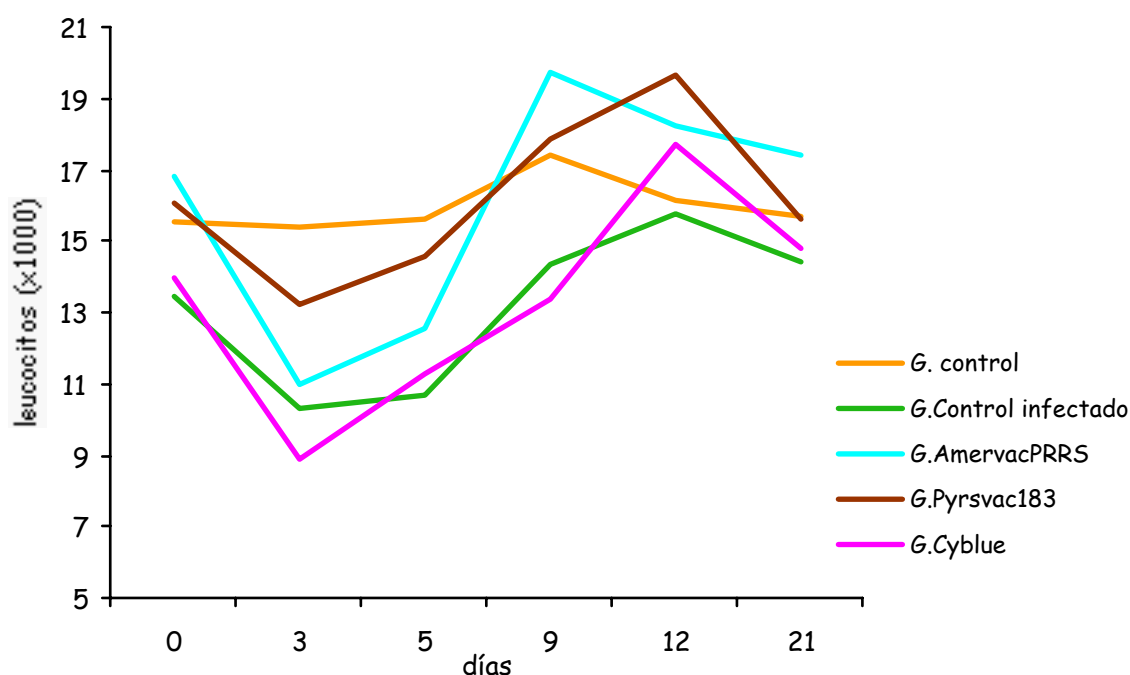


Figura 16. Valores medios de leucocitos en sangre periférica de los individuos de los grupos A, B, C, D y E en los días previo y posteriores a la inoculación de las cepas virulentas del VSRRP.

El porcentaje medio de linfocitos en los grupos C y D disminuyó en el día 3 p.i., siendo estadísticamente diferente del día 0 en el grupo D ( $p < 0,05$ ). En este grupo, se produjo en dicho día un aumento no significativo del porcentaje promedio de neutrófilos. En el grupo C, los neutrófilos disminuyen drásticamente en el día 9 p.i., difiriendo significativamente en relación al valor medio del día 0 ( $0 < 0,05$ ).

Los grupos B y E presentan una situación similar, los valores medios de linfocitos disminuyen en el día 9 p.i., en tanto que aumentan los valores promedios de neutrófilos. Ambas mediciones difieren estadísticamente de la obtenida en el día 0 ( $p < 0,05$ ) (figura 17).

En la tabla 14 se muestran los valores individuales obtenidos en los recuentos de leucocitos, linfocitos y neutrófilos.



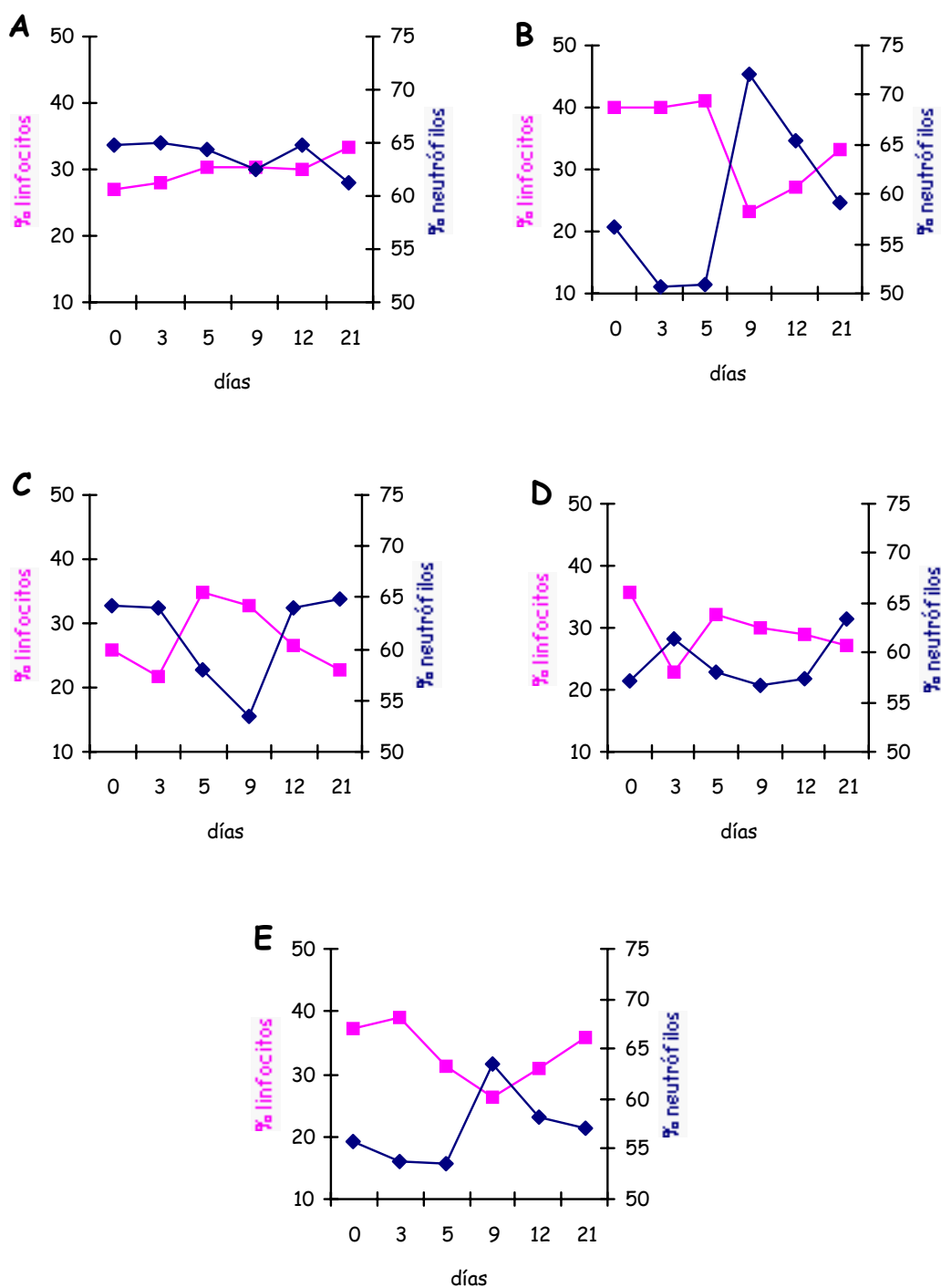


Figura 17. Evolución del porcentaje medio de linfocitos y neutrófilos en el grupo control (A), control infectado (B), vacuna AmervacPRRS (C), vacuna Pyrsvac-183 (D) y vacuna Cyblue (E), antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Tabla 14. Valores individuales de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en los animales de los grupos A, B, C, D y E, en el período correspondiente al desafío con cepas virulentas del VSRRP.

Grupo	Cerdas	D'as de obtenci—n de las muestras																	
		Leucocitos(x 1000)						% linfocitos						% neutr—filos					
		0	3	5	7	12	15	0	3	5	7	12	15	0	3	5	7	12	15
1	1	13,6	13,1	13,0	18,0	15,2	13,4	25	20	26	30	21	29	70	73	70	65	70	61
1	2	16,2	17,6	18,1	19,6	17,5	17,0	28	29	33	35	30	33	65	63	60	61	68	60
1	3	14,5	15,0	14,1	14,9	16,0	15,5	30	28	31	28	35	37	64	67	63	67	63	59
1	4	18,0	15,9	17,2	17,0	15,8	16,9	25	35	31	29	34	35	60	57	53	57	58	57
2	5	15,9	10,4	10,9	13,7	20,3	21,9	40	48	40	24	28	43	60	48	52	75	60	68
2	6	13,9	9,1	8,2	13,5	15,5	10,5	40	40	32	24	28	39	69	56	52	74	64	52
2	7	12,4	7,9	10,1	21,6	14,7	13,8	41	36	43	16	28	28	56	63	45	83	71	52
2	8	14,2	14,7	14,5	13,6	16,0	14,4	40	32	43	20	24	28	59	48	49	64	68	57
2	9	11,0	9,4	9,8	9,2	12,3	11,6	40	44	48	32	28	28	40	38	37	64	64	67
3	10	13,8	13,0	11,0	19,4	15,6	13,5	24	21	28	47	32	56	60	69	60	49	60	40
3	11	17,7	10,4	15,6	20,5	19,4	20,4	32	11	32	31	24	21	56	58	60	47	64	68
3	12	17,1	14,3	16,7	27,9	23,5	17,4	28	13	47	24	21	13	64	80	60	47	64	68
3	13	15,3	9,5	11,0	17,6	15,9	14,5	25	47	24	17	17	8	71	44	70	79	76	72
3	14	17,2	13	12,8	20,5	20,2	21,7	12	13	44	28	36	12	83	68	52	48	64	75
3	15	17	7,7	11,1	17,1	17,3	21,6	28	21	32	39	28	21	64	72	52	48	64	75
3	16	19,4	9	9,9	15,1	15,5	12,6	32	25	36	43	28	28	52	57	52	56	56	56
4	17	15,2	13,1	13	17,7	22,5	14,6	28	19	17	19	21	39	61	60	77	74	72	52
4	18	19,3	13,3	14,8	19,2	21,2	18,5	24	24	32	39	39	13	69	68	60	41	53	77
4	19	14	15,4	12,4	14,1	15,8	12,4	36	21	36	35	36	24	36	56	63	58	54	60
4	20	15	9,4	18,8	19	19,2	15,6	36	34	39	29	20	36	56	54	45	54	64	64
4	21	16,8	14,8	13,7	19,2	17,8	16,8	55	17	36	28	28	24	43	69	45	56	44	64
5	22	14,7	9,2	12,4	15,3	20,6	14,6	39	32	28	24	27	36	52	52	56	72	66	52
5	23	20,2	14,4	19	20,3	28,1	23,4	32	21	24	20	16	36	64	66	65	63	61	59
5	24	11	5,6	8,8	9,7	12,8	7,7	36	60	36	28	24	28	58	39	48	55	75	60
5	25	13	9,2	9,8	12,6	16,7	14,2	32	43	28	36	39	43	64	56	64	60	45	45
5	26	11	5,9	6,4	9,1	10,5	13,9	47	40	40	24	48	36	41	56	35	68	44	37

#### **4.2.1.2. Datos reproductivos y de producción**

Los datos de producción y días de gestación de cada cerda se presentan en la tabla 15, mientras en la tabla 16 se muestran los totales por grupo.

Las cerdas del grupo A parieron entre los días 113 y 115 de gestación, una media de 11 lechones por camada. Los lechones nacidos muertos representaron el 4,5% del total. Como se observa en la tabla, casi el 93% de los lechones nacidos vivos pesaron más de 0,9 kg, peso por debajo del cual se consideraron nacidos débiles. Durante los 21 días del período de lactación se produjeron 6 bajas, por lo que se destetó a un 83,3% de los lechones. La viabilidad al destete estuvo comprendida entre un 71,4% y un 91%. de las hembras número 3 y 2, respectivamente.

En el grupo B los partos se produjeron entre los días 109 y 115 de gestación. El tamaño medio de la camada fue de 10,6 lechones. El 43,4% de ellos nacieron muertos, y un 11,3% tuvieron un peso menor de 0,9 kg. Las bajas en lactación fueron superiores al 90% en las cerdas número 5, 6 y 8; del 50% en la cerda número 7 y del 33% en la hembra número 9. En este grupo se destetaron 7 cerdos (23,3%), pertenecientes a 3 camadas (cerdas número 1; 7 y 9). La viabilidad al destete no superó el 40%, considerando las camadas de forma individual.

Dentro del grupo vacunado con AmervacPRRS® (C), los partos se iniciaron con la cerda número 10, en el día 111 de gestación y concluyeron con la hembra número 16 que parió en el día 115 de gestación. El tamaño de las camadas osciló entre 8 y 14 cerdos, con una media de grupo de 11 lechones por camada. Los cerdos nacidos muertos fueron un 7,8%, con representación en todas las camadas, a excepción de las pertenecientes a las cerdas número 12 y 15. Los nacidos débiles (7,8%) correspondieron a las hembras número 10, 11 y 15. Las bajas durante la lactación no superaron el 30% de los cerdos nacidos vivos, y en el caso de la cerda número 16 no se registró ninguna. Se destetó un 85,9% de los cerdos nacidos vivos, con una viabilidad al destete por camada mayor al 70%.

En el grupo D (Pyrsvac-183®), los partos se produjeron entre los días 110 y 117 de gestación, con un total de 56 cerdos nacidos. De ellos, el 5,4% nacieron muertos y pertenecían a las camadas de las cerdas número 13 y 19 (1 y 2 animales, respectivamente). Del 5,7% de lechones nacidos débiles, dos lechones pertenecieron a la cerda número 17 y el otro correspondió a la hembra número 20. Durante la lactación se produjeron 10 bajas, lo que permitió destetar al 79,2% de los cerdos nacidos con vida.

Tabla 15. Datos de producción en las cerdas de los grupos A, B, C, D y E.

Grupo	Nº cerda	D'as gestación	Nacidos totales	Nacidos muertos		Nacidos vivos		Bajas lactación	Lechones destetados	% de Viabilidad al nacimiento <sup>1</sup>		Peso al destete
				totales	momias II	totales	<0,9 k			nacimiento	destete	
A	1	113	11	-	-	11	1	2	8	100	72,7	5
A	2	115	11	1	-	10	-	-	10	90,9	91	5,2
A	3	113	14	-	-	14	2	4	10	100	71,4	4,2
A	4	114	8	1	-	7	-	-	7	87,5	87,5	5
B	5	109	14	2	2	12	4	11	1	85,7	7,1	2,3
B	6	111	5	2	2	3	-	3	-	60	0	-
B	7	112	10	6	5	4	1	2	2	40	20	3,8
B	8	113	14	9	4	5	1	5	-	35,7	0	-
B	9	115	10	4	3	6	-	2	4	60	40	3,9
C	10	111	14	1	1	13	3	3	10	92,8	71,4	4,1
C	11	114	13	1	-	12	2	1	11	92,3	84,6	4,9
C	12	114	11	-	-	11	-	3	8	100	72,7	3,7
C	13	113	8	1	1	7	-	1	6	87,5	75	5,7
C	14	113	10	1	-	9	-	1	8	90	80	5,2
C	15	114	11	-	-	11	1	1	10	100	90,9	4,8
C	16	115	10	2	2	8	-	-	8	80	80	5,7
D	17	114	14	-	-	14	2	3	11	100	78,6	4,5
D	18	110	12	1	-	11	-	3	8	91,7	66,7	4,6
D	19	117	10	-	-	10	-	1	9	100	90	5,1
D	20	112	10	-	-	10	1	2	8	100	80	5,3
D	21	115	10	2	2	8	-	2	6	80	60	4,4
E	22	114	10	4	3	6	1	1	5	60	50	3,2
E	23	113	14	4	3	10	3	4	6	71,4	43	3,4
E	24	113	14	7	7	7	2	2	5	50	36	3,9
E	25	112	8	2	-	6	-	1	5	75	62,5	4,7
E	26	110	5	3	1	2	1	2	-	40	0	-

1: Viabilidad de la camada: número de lechones vivos dividido por el número total de lechones nacidos

Tabla 16. Resumen de los datos productivos en los grupos A, B, C, D y E.

Grupo	N <sup>1/4</sup> camadas	Nacidos totales	Nacidos muertos		Nacidos vivos		Bajas lactaci—rle destetados	Lechones destetados	Peso al destete
			totales	momias II	totales	<0,9 k			
A	4	44 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup> (4,5)*	0 <sup>c</sup>	42 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup> (6,8)	6 (14,3)	36 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>
B	5	53 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup> (43,4)	16 <sup>a</sup> (30,2)	30 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup> (11,3)	23 (76,7)	7 <sup>b</sup>	3,3 <sup>b</sup>
C	7	77 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup> (7,8)	4 <sup>b,c</sup> (5,2)	71 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup> (7,8)	10 (14,1)	61 <sup>a</sup>	4,9 <sup>a</sup>
D	5	56 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup> (5,4)	2 <sup>c</sup> (3,6)	53 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup> (5,4)	11 (20,8)	42 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>
E	5	51 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup> (39,2)	14 <sup>a,b</sup> (27,5)	31 <sup>b</sup>	7 <sup>a</sup> (13,7)	10 (32,3)	21 <sup>a,b</sup>	3,8 <sup>b</sup>

\* Porcentajes

a,b,c: los números dentro de una columna con la misma letra no son estadísticamente significativos ( $p \geq 0,05$ )

Las cerdas que recibieron la VI (grupo E) parieron entre los días 110 y 114 de gestación. El total de lechones nacidos estuvo comprendido entre 5 de la cerda 26 y 14 lechones en las hembras número 23 y 24. El número de cerdos nacidos muertos por camada estuvo comprendido entre un 25% de la cerda número 25 y el 60% correspondientes a la hembra 26. La media del grupo fue de 39,2%. El destete fue de un 67,7%, correspondiendo a cuatro camadas. De la cerda número 22 ningún cerdo llegó vivo a los 21 días de lactación. La viabilidad al destete no superó en ninguna cerda el 63%.

El análisis estadístico no reveló ninguna diferencia entre los grupos respecto al número de lechones nacidos totales y lechones nacidos débiles ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, cuando se compararon estadísticamente el número de lechones nacidos muertos y nacidos vivos, se observaron diferencias significativas entre los grupos A, C y D en relación con los grupos B y E, donde el rendimiento productivo fue inferior ( $p < 0,001$ ). En cuanto a las bajas producidas durante la lactación, y por ende el número de lechones destetados, se establecieron tres categorías que presentaron diferencias estadísticamente significativas

entre sí ( $p < 0,001$ ). Las categorías citadas estuvieron formadas de la siguiente forma: i) grupos A, C y D, ii) grupo E, con resultados intermedios y iii) grupo B.

En cuanto a los cerdos nacidos muertos (figura 18), se hallaron 4 momias tipo I, con tamaño inferior a los 13 cm, en las cerdas número 8; 11 y 23. El número de fetos momificados tipo II, fue mayor en los grupos B y E, donde todos los individuos, a excepción de la hembra número 25 del grupo E presentaron al menos un feto de esta categoría. En el grupo C, hubo un 5,2% de momias tipo II y pertenecieron a las hembras número 10,13 y 16. En tanto que en el grupo D, el porcentaje fue ligeramente inferior (3,6%) y afectó a la camada de la hembra número 21. Ninguna cerda del grupo A parió este tipo de fetos. El análisis estadístico de estos datos permitió revelar diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) (tabla 16).

El número de fetos nacidos muertos de apariencia normal fue ligeramente superior entre las cerdas del grupo control infectado (B) y las que recibieron la vacuna Cyblue® (grupo E), no obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los restantes grupos ( $p > 0,05$ ).

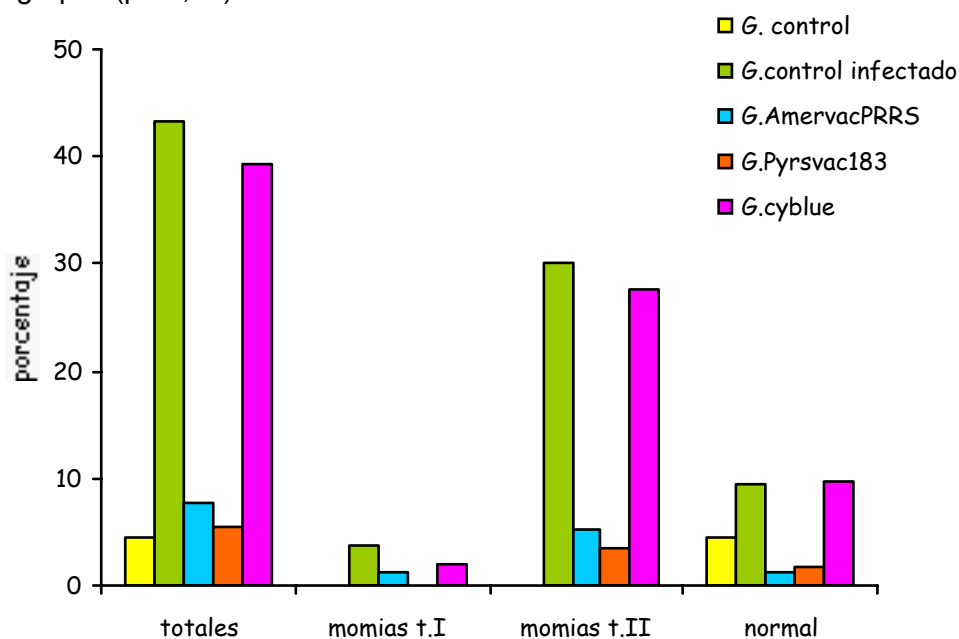


Figura 18. Distribución de los lechones nacidos muertos en los grupos A, B, C, D y E. El número total de lechones nacidos muertos y los fetos momificados de tipo II presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Las bajas ocurridas durante el período de lactación tuvieron distintos orígenes (tabla 17). La causa más común fue la muerte por aplastamiento causada por la hembra, que llegó a ser responsable de un 13% de las bajas ocurridas en el grupo B. En este grupo, la diarrea fue la causa que más casos de mortalidad produjo, un 23,3%. En todas las camadas de este grupo la diarrea apareció en el primer día de vida de los lechones y persistió en muchos casos hasta el momento del destete, a pesar del tratamiento parenteral con gentamicina que se administró. Entre las crías de las hembras número 5; 6 y 9 se observaron lechones con conjuntivitis, además en esta última camada los lechones presentaron dificultad respiratoria, que fueron muy manifiestas cuando se los sometía a un esfuerzo físico, por ejemplo la toma de muestra de sangre. En general, todas las camadas del grupo B presentaron un aspecto menos saludable que las camadas del resto de los grupos.

Tabla 17. Lechones muertos durante el período de lactación, distribuidos por grupo y causa.

Grupo	Bajas Lactación	Causas de bajas en lactación							
		Asfixia	B.viabil.	Hipogluc.	Aplastam.	Diarrea	Perit/peric	latrogenia	otras
A	6	-	-	2 (4,8) <sup>a</sup>	4 (9,5)	-	-	-	-
B	23	1 (3,3)	2 (6,7)	3 (5,7)	4 (13,3)	10 (23,3)	2 (6,7)	1 (4,4)	-
C	10	-	1 (1,4)	1 (1,4)	5 (7)	-	1 (1,4)	1 (1,4)	-
D	11	1 (1,9)	-	-	6 (11,3)	-	1 (1,9)	-	3 (5,7)
E	10	-	-	3 (9,7)	3 (9,7)	1 (3,2)	-	2 (6,4)	1 (3,2)

a: porcentajes

Como se puede observar en la figura 19, la viabilidad, tanto al nacimiento como al destete fue inferior en los grupos B y E ( $p < 0,05$ ).

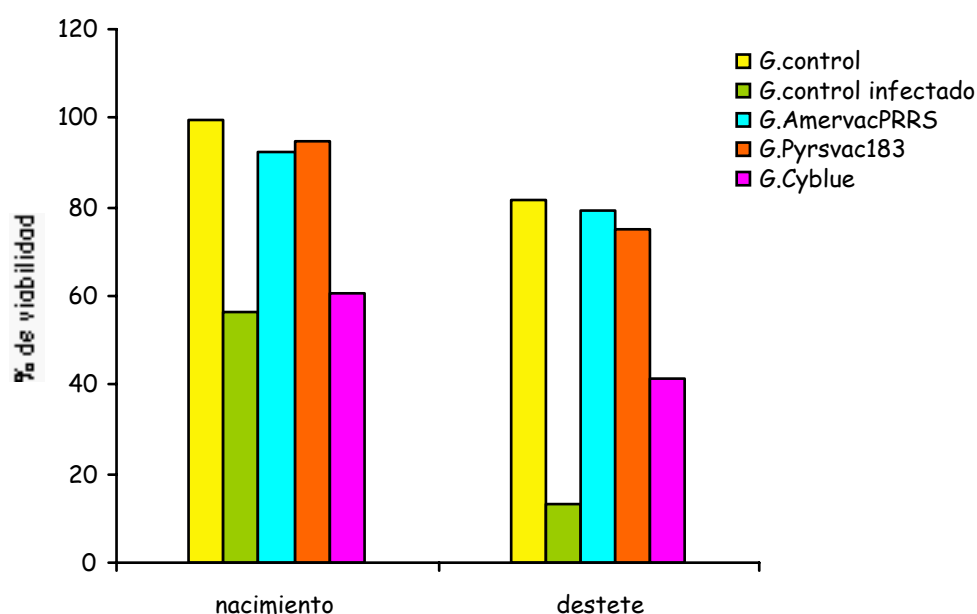


Figura 19. Viabilidad promedio de cada grupo al momento del nacimiento y del destete. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ambos momentos ( $p < 0,05$ ).

El peso promedio de las camadas al momento del nacimiento fue muy similar en todos los grupos y rondó los 1000 gr (figura 20). El análisis estadístico de estos datos no reveló diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

Cuando se analizó el peso al destete de cada camada, se pudo observar que el grupo control infectado, de las 3 camadas que se destetaron, no superaron los 4kg. En el grupo E (vacuna inactivada), sucedió lo mismo con las camadas de las cerdas 22, 23 y 24; sin embargo los cinco lechones destetados de la cerda número 25 pesaron en promedio 4,7kg. El peso de las camadas de los grupos A, C y D estuvo más cercano a los 5kg, excepción hecha en la cerda número 12 perteneciente al grupo C, donde el promedio fue de 3,7kg. El estudio estadístico llevado a cabo demostró diferencias significativas en este parámetro, entre los valores medios de las camadas de los grupos A, C y D en relación a los grupos B y E ( $p < 0,01$ ). El mismo resultado se obtuvo cuando se compararon la ganancia de peso a los 21 días ( $p < 0,01$ ).



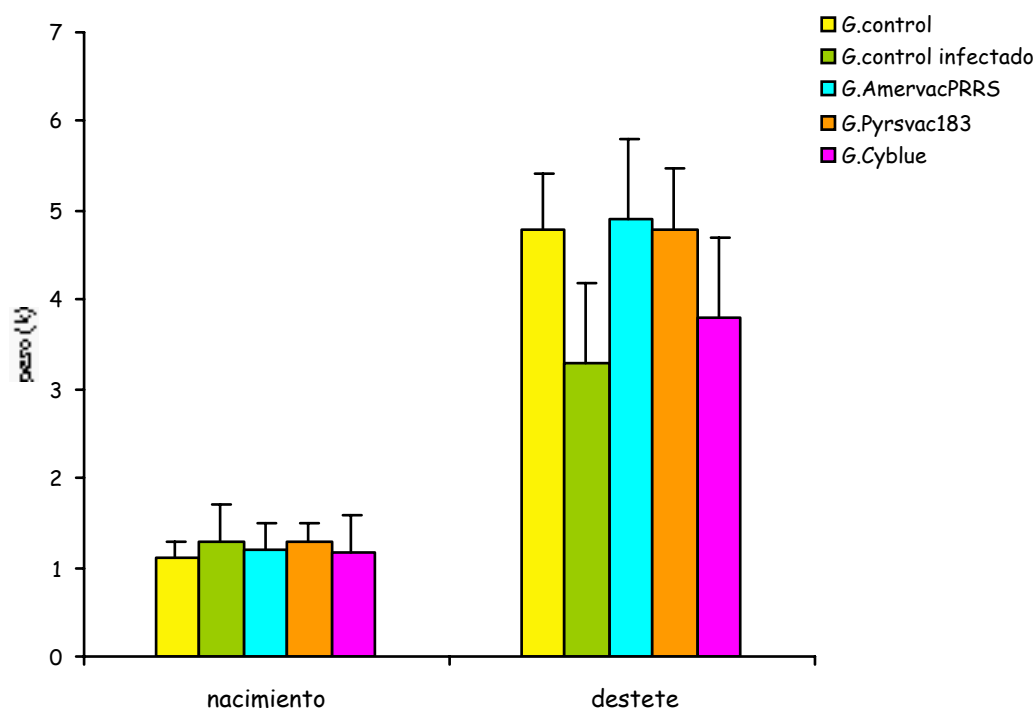


Figura 20. Peso medio de los lechones por grupo analizado al momento del nacimiento y del destete. Las barras representan una desviación estándar. El valor medio de los pesos por grupo al momento del nacimiento no difiere estadísticamente. Los pesos alcanzados al destete, así como en el incremento de peso revelan diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.3. Serología

##### i. Cerdas

En los animales del grupo control no infectado (A) no se detectaron, a lo largo del período de estudio, anticuerpos contra el VSRRP, ya sea empleando la técnica de SN o de ELISA. Los resultados de las pruebas serológicas de SN y ELISA en los grupos B, C, D y E aparecen reflejados en las figuras 21 y 22 así como en las tablas 18 y 19, respectivamente.

Los animales que recibieron vacunas conteniendo virus modificado (grupos C y D) produjeron AcNt. que se detectaron a partir del día 7 p.v.. Por el contrario, en el grupo que recibió la vacuna inactivada (grupo E) estos anticuerpos no se detectaron hasta después de la

inoculación experimental. En el grupo C y D se produjo después del desafío con el VSRRP una respuesta inmune secundaria, que alcanzó una mayor magnitud que la desarrollada después de la aplicación de la vacuna.

Todos los animales del grupo C mostraron anticuerpos a partir del día 12 p.v, alcanzando el pico entre los días 20 y 36 p.v, correspondiendo a valores individuales máximos de 1:16. A partir de entonces, los títulos oscilaron a niveles un poco más bajos y al momento del desafío, 5 cerdas presentaron un título de 1:4, mientras que en las dos restantes fue de 1:8 (animal número 11 y 12). Inmediatamente después del desafío los títulos empezaron a subir para llegar a 1:256 en la hembra número 12 en el día 28 p.i. En ese día se alcanzó el pico máximo del promedio del grupo.

Los animales del grupo D (Pyrsvac-183<sup>®</sup>), exhibieron un comportamiento similar al descrito anteriormente. En el día 7 p.v., la cerda número 20 fue positiva con un título de 1:2, en tanto que la cerda número 19 no lo hizo hasta el día 20 p.v. Esta cerda, presentó títulos relativamente bajos e incluso negativos durante el período posterior a la vacunación. En la cerda número 21 se observaron títulos bajos a partir del día 64 p.v., llegando a ser negativos en tres oportunidades (días 78 y 106 p.v., y en el día 0 p.i.). Después del desafío, los títulos empezaron a subir para alcanzar los máximos hacia el día 28 p.i., a partir de donde inició un suave descenso.

En los animales del grupo E, no se detectaron AcNt. hasta el día 5 p.i., alcanzado el máximo en los días 35 y 49 p.i, con títulos de hasta 1:128. Los títulos exhibidos en este grupo son ligeramente inferiores al de los grupos C y D, en este mismo período.

Los individuos del grupo control infectado, fueron negativos hasta después de la inoculación con el VSRRP. En el día 5 p.i la cerda número 9 dió positiva con un título 1:2, en las hembras restantes los AcNt. se detectaron en el día 9 p.i.. Los títulos máximos se alcanzaron en los días 35 y 49 p.i., con niveles inferiores a los registrados en los grupos anteriormente descritos.

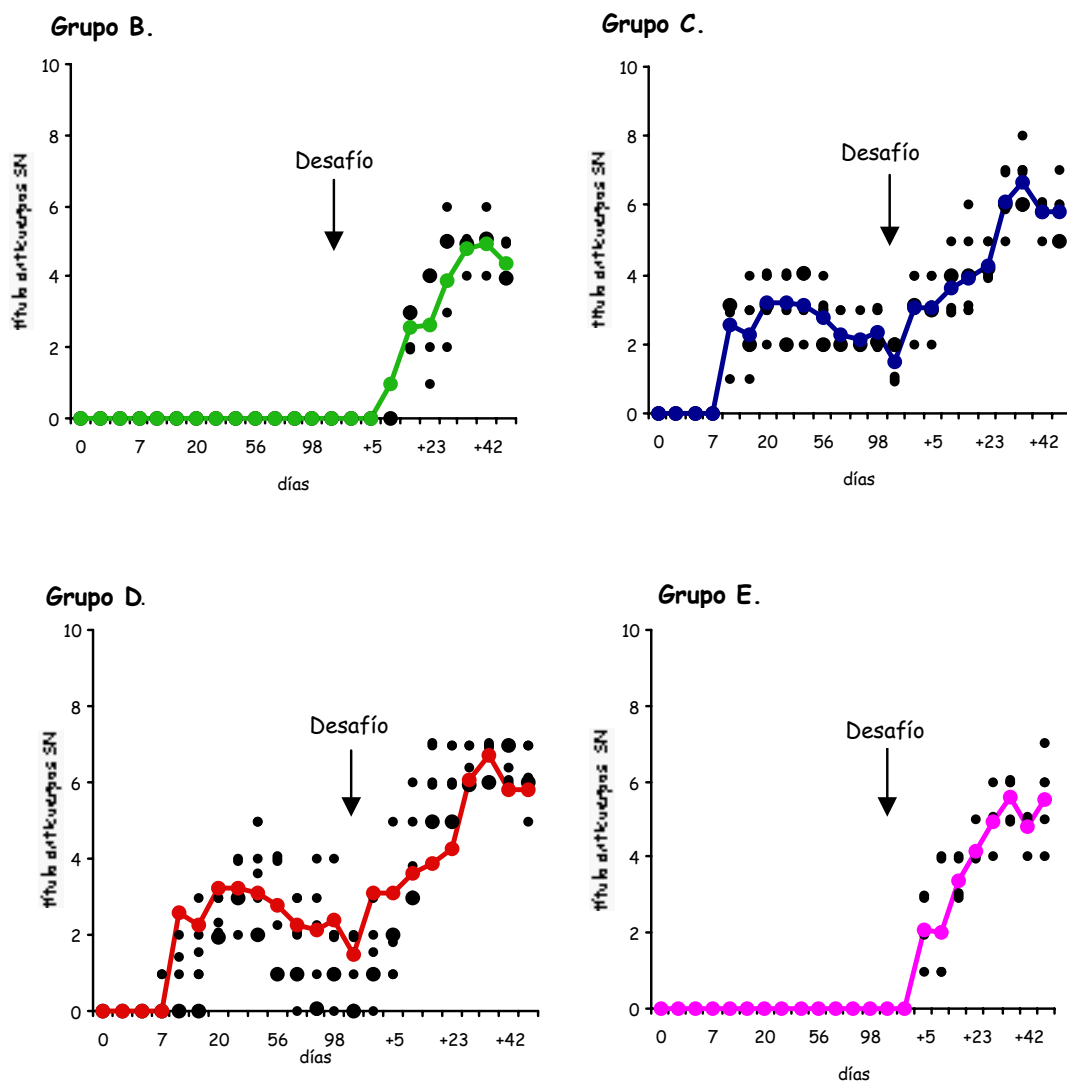


Figura 11. Respuesta inmune frente al VSRRP, medida por seroneutralización, en los grupos B, C, D y E, a lo largo del período de estudio. La línea continua representa los valores medios en cada momento.

Tabla 18. Títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VSRRP en cerdas pertenecientes a los grupos B, C, D y E, a lo largo del período de estudio.

Grupo	Nº de	D'as de toma de muestra																							
		Cerda	0	3	5	7	12	15	21	42	56	70	84	90	104	+0	+3	+5	+9	+12	+23	+28	+35	+42	+49
B	5	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	2	4	16	32	16
B	6	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	4	8	32	32	32
B	7	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	8	16	32	32	32	16
B	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	8	16	32	32	16	16
B	9	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	8	16	64	32	64	32
C	10	<2	<2	<2	<2	8	4	8	4	16	4	4	4	4	4	8	16	16	16	16	64	64	64	32	32
C	11	<2	<2	<2	<2	8	4	16	8	16	8	4	4	8	8	8	8	8	16	32	64	64	64	64	64
C	12	<2	<2	<2	<2	8	16	16	16	8	8	4	8	8	8	16	32	64	16	128	256	64	64	64	
C	13	<2	<2	<2	<2	8	8	16	16	8	16	8	4	4	4	4	8	32	32	128	128	64	32	32	
C	14	<2	<2	<2	<2	2	2	8	8	4	8	4	4	8	4	16	16	8	16	64	64	32	64	64	
C	15	<2	<2	<2	<2	8	4	8	16	8	8	4	4	4	4	8	16	16	16	64	128	64	128	128	
C	16	<2	<2	<2	<2	8	8	4	8	8	4	8	4	4	4	8	8	8	32	64	128	64	64	64	
D	17	<2	<2	<2	<2	4	8	8	16	8	16	8	16	16	8	32	64	64	128	128	128	64	128	128	
D	18	<2	<2	<2	<2	<2	2	4	8	32	16	4	2	4	4	4	8	64	128	64	128	64	32	64	
D	19	<2	<2	<2	<2	<2	1	4	8	4	2	2	<2	2	2	4	8	8	32	64	64	128	64	64	
D	20	<2	<2	<2	2	<2	2	8	16	16	16	8	8	4	2	2	32	64	64	128	128	128	128	64	
D	21	<2	<2	<2	<2	2	4	4	4	32	2	<2	<2	<2	<2	2	8	64	32	64	128	64	64	32	
E	22	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	8	16	16	32	64	64	32	64	
E	23	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	8	16	16	16	16	64	32	128	
E	24	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	2	8	16	32	32	32	16	
E	25	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	2	8	16	32	64	32	64	
E	26	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	4	8	16	32	32	16	32	

Con el ensayo de ELISA indirecto para detectar anticuerpos contra el VSRRP se observó que todos los animales que recibieron vacuna (grupos C, D y E) desarrollaron una respuesta inmune primaria. De esta forma, en el grupo C (AmervacPRRS®), los anticuerpos se detectaron primeramente en el día 7 p.v., en la cerda número 16 (título de 1:400). Mientras que la hembra número 14, que reaccionó con un título  $\geq 1.600$  en el día 15 p.v.; y la cerda número 10 en el día 20 p.v. Esta hembra sólo fue positiva hasta el día 36 p.v. a partir de cuando se detectaron títulos inferiores a 1:200 hasta después del desafío. En la cerda número 14, en los días 64 y 92 p.v, día 0 y día 5 p.i. se registraron valores inferiores a 1:200. La respuesta inmune primaria media de este grupo alcanzó la máxima expresión en el día 36 p.v., en tanto que la respuesta secundaria fue máxima en el día 12 p.i.

En el grupo D (Pyrsvac-183®), la cerda número 19 fue positiva en el día 7 p.v., en tanto que la cerda número 21 no lo fue hasta el día 36 p.v. Los valores máximos individuales del período correspondiente a la vacunación se registraron entre los días 15 y 36 p.v. Al momento de la inoculación experimental, todas las cerdas presentaron títulos de anticuerpos detectados por ELISA, del orden de 1:200 ó 1:400. La respuesta secundaria fue ligeramente superior y alcanzó su máxima expresión entre los días 12 y 23 p.i.

El análisis estadístico reveló diferencias entre los grupos C y D (vacunas atenuadas) en relación al resto de los grupos en todas las muestras obtenidas hasta el día 3 p.i. ( $p < 0,001$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos C y D en el momento del desafío ( $p < 0,001$ ). En el día 5 p.i., los títulos de AcNt. medios obtenidos en los tres grupos vacunados difieren de los controles ( $p < 0,01$ ).

Todas las cerdas del grupo E (Cyblue®), en el día 36 p.v. presentaron anticuerpos en la prueba de ELISA, con títulos de 1:200 y 1:400. La hembra número 22 fue la primera en reaccionar, en el día 5 p.v, la cerda número 23 lo hizo en el día 15 p.v y las hembras número 25 y 26 en el día 20 p.v. En el período correspondiente a la post-vacunación los títulos de ELISA obtenidos en este grupo fueron inferiores a los del grupo C y D, no superando el título de 1:400. Después del día 5 p.i., los niveles de anticuerpos empezaron a subir, alcanzando los máximos en el día 12 p.i., esta vez sin presentar diferencias con los dos grupos anteriores.

Dentro del grupo B, control infectado, los animales estuvieron exentos de anticuerpos contra el VSRRP detectados mediante la prueba de ELISA hasta después del desafío. De esta forma, la cerda número 2 presentó un título de 1:200 en el día 5 p.i, mientras que las

cuatro cerdas restantes fueron positivas en el día 9 p.i., con títulos de 1:200 a 1:800. La máxima producción de anticuerpos se detectó en el día 23 p.i., con niveles ligeramente más bajos que los exhibidos en los grupos de cerdas vacunadas.

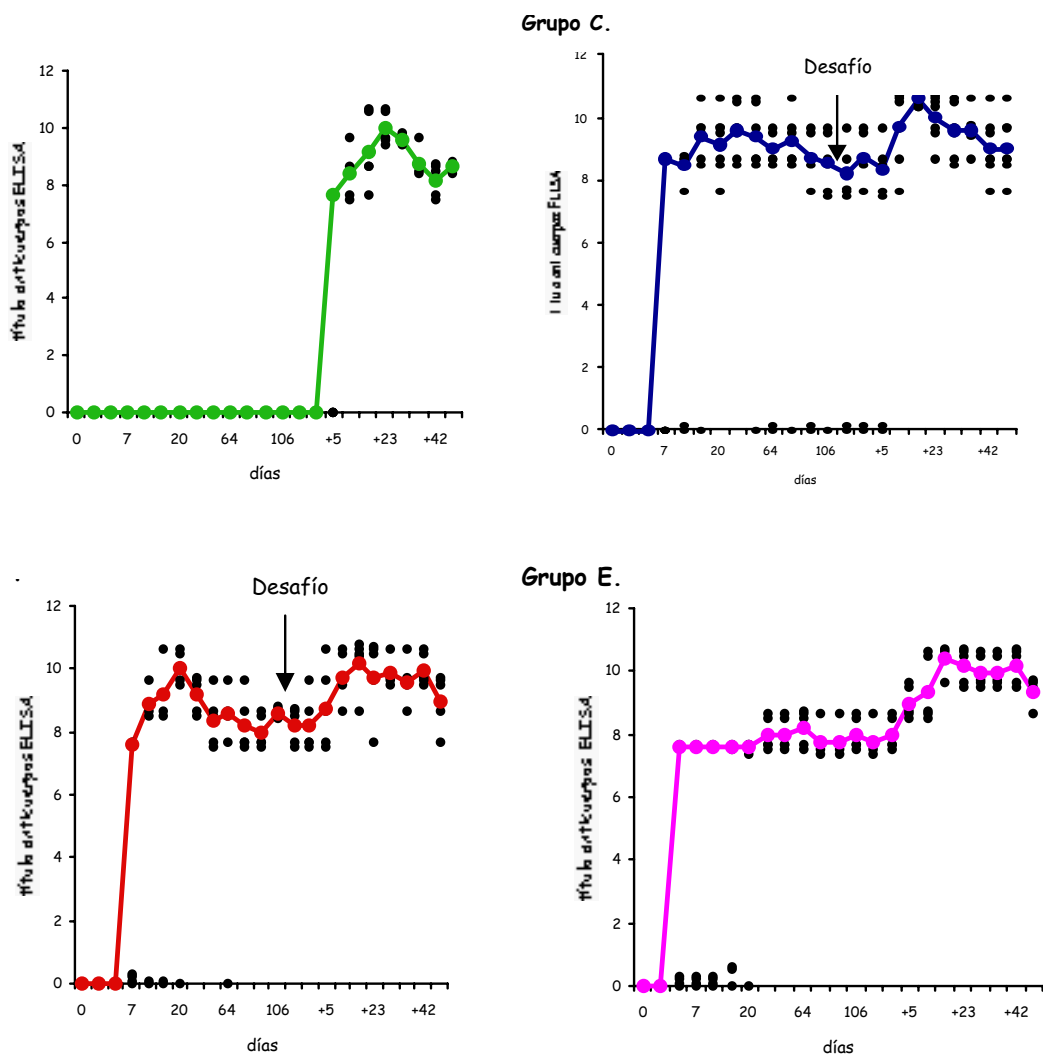


Figura 22. Títulos de anticuerpos frente al VSRRP, determinados por la técnica de ELISA, en los sueros obtenidos de las cerdas de los grupos A, B, C y D durante el período de estudio, expresados como log2. La línea continua representa los valores medios obtenidos en cada momento.

Tabla 19. Resultados del estudio de determinación de anticuerpos frente al VSRRP por la técnica de ELISA en las cerdas de los grupos B, C, D y E, a lo largo del período de estudio.

Grupo	Nº de	D'as de muestreo																							
		Cerda	0	3	5	7	12	15	21	42	56	70	84	90	104	+0	+3	+5	+9	+12	+23	+28	+35	+42	+49
B	5	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	400	400	<sup>3</sup> 1600	800	400	200	400
B	6	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	800	<sup>3</sup> 1600	800	800	400	400	400
B	7	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	400	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	400	400	400
B	8	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	400	800	800	400	400	400
B	9	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	200	800	800	800	200	400
C	10	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	400	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	<200	<200	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	400	800	800	400	400
C	11	<200	<200	<200	<200	400	800	800	800	400	400	400	400	200	200	<200	200	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	400	200	
C	12	<200	<200	<200	<200	400	800	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	400	400	400	400	400	400	400	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	
C	13	<200	<200	<200	<200	200	400	400	800	400	400	800	200	200	200	<200	200	200	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	<sup>3</sup> 1600	
C	14	<200	<200	<200	<200	<200	<sup>3</sup> 1600	800	800	<sup>3</sup> 1600	<200	400	<200	800	<200	400	<200	800	<sup>3</sup> 1600	800	400	800	<sup>3</sup> 1600	800	
C	15	<200	<200	<200	<200	400	800	800	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	800	800	800	400	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	400	400	
C	16	<200	<200	<200	400	400	400	400	400	400	800	<sup>3</sup> 1600	800	400	200	800	800	400	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	400	400	200	400	
D	17	<200	<200	<200	<200	800	400	800	800	200	400	200	200	400	400	200	400	800	<sup>3</sup> 1600	200	800	<sup>3</sup> 1600	800	400	
D	18	<200	<200	<200	<200	400	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	400	400	400	200	400	200	200	200	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	<sup>3</sup> 1600	800	
D	19	<200	<200	<200	200	400	400	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	800	200	400	400	400	800	800	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	800	800	
D	20	<200	<200	<200	<200	<200	<200	800	400	400	200	200	400	400	400	800	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	<sup>3</sup> 1600	800	
D	21	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	400	200	<200	200	400	400	200	200	<200	400	400	<sup>3</sup> 1600	800	400	800	200	
E	22	<200	<200	200	200	200	200	200	400	200	400	200	400	400	400	400	800	<sup>3</sup> 1600	800	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	
E	23	<200	<200	<200	<200	<200	200	200	400	400	400	200	200	200	200	200	400	400	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	
E	24	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	200	400	400	200	400	200	200	800	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	<sup>3</sup> 1600	800	800	<sup>3</sup> 1600	800	
E	25	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	200	400	200	200	200	200	200	400	400	400	<sup>3</sup> 1600	800	800	<sup>3</sup> 1600	800	400	
E	26	<200	<200	<200	<200	<200	<200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	400	400	<sup>3</sup> 1600	800	800	800	<sup>3</sup> 1600	800	

## ii. Lechones

Los análisis serológicos, ELISA y SN, se llevaron a cabo a partir de las muestras de suero obtenidas de los lechones destetados, cuyos resultados se reflejan en la tabla 20. Como se aprecia en dicha tabla, la mayoría de los sueros recogidos antes de la ingestión del calostro (día 0), presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes inferiores a 2. No obstante en los grupos C, D y E hubo un 26,2%, 28,6% y 9,5% respectivamente, de lechones cuyos títulos fueron de 1:2 ó 1:4. En el grupo C, las camadas de las cerdas número 10 y 11 tuvieron el mayor número de lechones con título igual o superior a 1:2 (6 de 10 lechones y 4 de 11 lechones, respectivamente). De la misma forma, la cerda número 17 y 19 del grupo D tuvieron un 45,5% y un 33,3% de lechones positivos en el suero del día 0. En el grupo E, los dos sueros con títulos iguales o superiores a 1:2 se dieron en los lechones de la cerda número 24. Los lechones del grupo A permanecieron con títulos inferiores a 1:2 durante todo el estudio.

Al destete, en el grupo control infectado todos los lechones exhibieron títulos inferiores a 1:2, a excepción de un lechón de la hembra número 9. En el grupo C, todos los reaccionaron ante la detección de AcNt., con un título medio de 37,5. En tanto que en el grupo D el título medio fue de 37,9. En este grupo, la camada de la cerda número 17 presentó los títulos promedios mayores a la media del resto del grupo (351), mientras que los lechones pertenecientes a la cerda número 21 tuvieron una media de 1:2. En dos camadas del grupo E (Cyblue®) se hallaron títulos de AcNt (cerdas número 23 y 24), otorgando una media de 4,8.

Mediante el ensayo de ELISA, 15 sueros del día 0 fueron positivos; de los cuales 11 correspondieron a títulos de AcNt. < 1:2 (73%). Cuando se realizó este mismo ensayo con los sueros recogido al momento del destete, los lechones de todos los grupos fueron positivos, a excepción de un lechón del grupo B.



Tabla 20. Resultado de la detección de anticuerpos seroneutralizantes contra el VSRRP, en muestras de suero del día 0 y día 21 obtenidas de los lechones destetados en los grupos B, C, D y E.

Grupo	N <sup>1</sup> / <sub>4</sub> cerda	d'a 0		d'a 21	
		n <sup>1</sup> / <sub>4</sub> lechones	t'tulo medio	n <sup>1</sup> / <sub>4</sub> lechones	t'tulo medio
B	5	0/1 <sup>1</sup>	-	0/1	-
B	6	-	-	-	-
B	7	0/2	-	1/2	2
B	8	-	-	-	-
B	9	0/4	-	0/4	-
C	10	6/10	2,2	10/10	111,4
C	11	4/11	2,4	11/11	24,9
C	12	1/8	4	8/8	30,1
C	13	1/6	2	6/6	16
C	14	2/8	2	8/8	45,3
C	15	2/10	2	10/10	12,1
C	16	1/8	2	8/8	107,3
D	17	5/11	2	11/11	351
D	18	1/8	2,8	7/8	22,6
D	19	3/9	2	9/9	18,4
D	20	2/8	2,8	8/8	32
D	21	0/6	-	5/6	2
E	22	0/5	-	0/5	-
E	23	0/6	-	3/6	5
E	24	2/5	2,8	1/5	4
E	25	0/5	-	0/5	-
E	26	-	-	-	-

1: muestra con t'tulo <sup>2</sup> / muestra analizada.

#### 4.2.1.4. Detección del VSRRP

##### i. En las cerdas

Todas las muestras de suero obtenidas antes y después de la vacunación de las cerdas de los grupos C y D (vacunas atenuadas) fueron negativas al aislamiento vírico en cultivos de MAP. Sin embargo, cuando esas mismas muestras se inocularon en células MARC-145, se obtuvieron resultados positivos entre el día 3 y 12 p.v. (tabla 21). Como se puede apreciar, todos los animales, a excepción de las cerdas número 14 y 21, fueron positivos en el día 3 y 5 p.v., fundamentalmente. Los títulos víricos obtenidos fueron en general bajos, inferiores al log 3,3 DI<sub>50</sub>CT/ml de suero.

Todos los hisopos nasales y las muestras fecales obtenidas durante este período fueron negativas, tanto en cultivos de MAP como en la línea MARC-145.

Las muestras obtenidas de las cerdas pertenecientes a los grupos A y B fueron negativas durante este período.

Tabla 21. Resultados del aislamiento del VSRRP en la línea celular MARC-145, a partir de las muestras de suero obtenidas de las cerdas de los grupos C y D, antes y después de la vacunación y titulación de las positivas.

N <sup>o</sup> Cerde	Días de obtención de las muestras					
	0	3	5	7	12	21
Grupo C						
10	-	+ (2,4)	+ (2,2)	-	-	-
11	-	+ (3,3)	+ (2)	-	-	-
12	-	+ (2,2)	+ (2,2)	-	-	-
13	-	+ (1,5)	+ (<1)	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	+ (2,5)	+ (3,3)	+ (2,4)	-	-
16	-	+ (2,3)	+ (<1)	-	-	-
Grupo D						
17	-	+ (<1)	+ (1,2)	-	-	-
18	-	+ (<1)	-	-	+ (1,5)	-
19	-	+ (1)	+ (2,4)	-	-	-
20	-	-	+ (2,6)	-	-	-
21	-	+ (1)	+ (2,2)	-	-	-

-: muestra negativa ; +: muestra positiva

Los títulos víricos están calculados como DICT/ml, y están expresados en la forma de log X, siendo X el número que aparece entre paréntesis

Todas las muestras de sangre obtenidas en el día 90 de gestación fueron negativas al VSRRP, en cultivos de MAP y en la línea celular MARC-145. Después del desafío con las cepas virulentas del VSRRP, todos los animales de los grupos B y E presentaron viremias, que en algunos casos duró hasta el día 12 p.i. Dentro del grupo C, se aisló el VSRRP en 4

individuos en los días 3 y 5 p.i. En el grupo D, se detectaron dos animales virémicos (tabla 22).

Respecto a las muestras de hisopos nasales, se detectaron 4 animales positivos en el grupo B, en los días 3 y/o 5 p.i. Mientras que en el grupo C (AmervacPRRS<sup>®</sup>) solamente dos cerdas fueron positivas en el día 3 p.i. y en el grupo E en dos animales se detectó el virus en los días 3 y 5 p.i. En todos los casos el título fue inferior a log 1 DI<sub>50</sub>CT (tabla 22).

Las muestras fecales fueron negativas en todos los casos. Todas las muestras obtenidas en el grupo A fueron negativas cuando se intentó el aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP.

En los órganos recogidos a la necropsia de las cerdas, no fue posible demostrar la presencia del VSRRP en cultivos de MAP.

Tabla 22. Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP, a partir de las muestras de suero e hisopos nasales obtenidas antes y después de la inoculación con el virus en las cerdas de los grupos B, C, D y E.

Nº	Días de obtención de las muestras de										
	suero					hisopos nasales					
Cerda	0	3	5	9	12	21	0	3	5	9	12
Grupo B											
5	-	+(2,5)	+(3,6)	+(4,7)	+(3,9)	-	-	-	-	-	-
6	-	+(2,2)	+(3,5)	+(3,6)	-	-	-	+( $<1$ )	+( $<1$ )	-	-
7	-	+(2,5)	+(3,6)	-	-	-	-	+( $<1$ )	+( $<1$ )	-	-
8	-	+(2,5)	+(2,6)	+( $<1$ )	-	-	-	-	+( $<1$ )	-	-
9	-	-	-	+( $<1$ )	-	-	-	-	+( $<1$ )	-	-
Grupo C											
10	-	+(1,4)	+(3,2)	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	+(3,4)	+(3,1)	-	-	-	-	+( $<1$ )	-	-	-
14	-	+(2,6)	-	-	-	-	-	+( $<1$ )	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+(2,6)	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo D											
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	+(2,6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	+(2,9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo E											
22	-	+(3)	+(3,6)	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	+(2,7)	+(2,7)	-	-	-	-	+( $<1$ )	+( $<1$ )	-	-
24	-	+(2,6)	+(3,5)	-	-	-	-	+( $<1$ )	+( $<1$ )	-	-
25	-	+(2,7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	+(2,2)	+(3,5)	+(4,2)	-	-	-	-	-	-	-

-: muestra negativa ; +: muestra positiva

Los títulos víricos están calculados como D<sub>50</sub>CT/ml, y están expresados en la forma de log X, siendo X el número que aparece entre paréntesis

## ii. En lechones

El VSRRP pudo aislarse en cultivos de MAP en todas las camadas del grupo B y E (grupos control infectado y vacuna Cyblue®), en 3 de las 7 del grupo C y en 4 del grupo D. Todos los lechones del grupo A fueron negativos al aislamiento vírico. En la tabla 24 se muestra los resultados del aislamiento vírico en las distintas camadas. Del total de lechones nacidos fueron positivos al aislamiento del virus, un 84,9%; 10,4%; 32,1% y 70,5% en los grupos B, C, D y E, respectivamente (figura 23). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ), excepción hecha entre los grupos B y E.

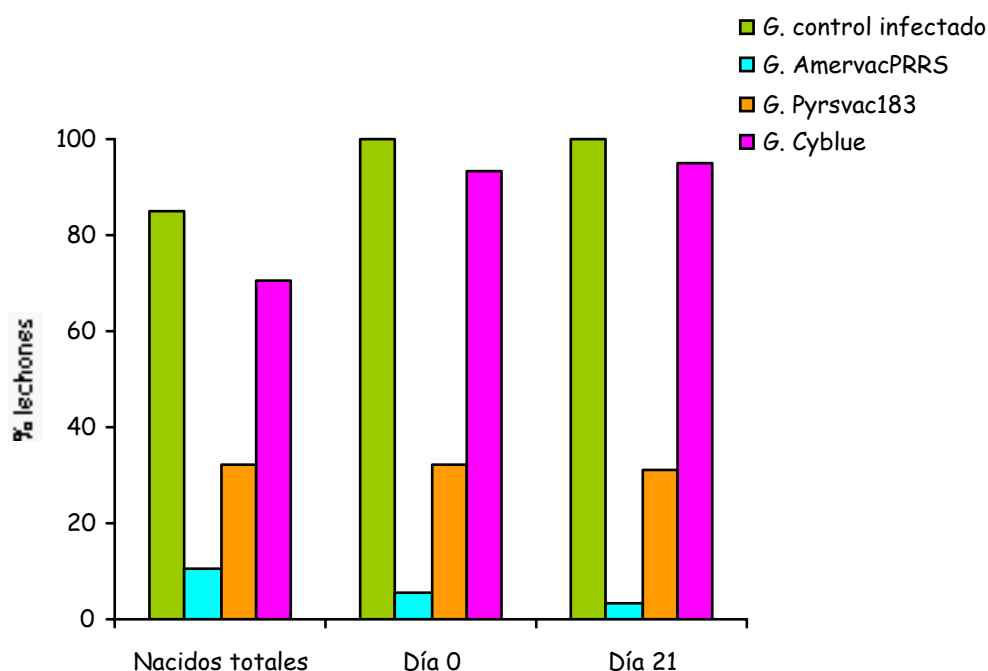


Figura 23. Porcentajes de lechones con aislamiento vírico positivo en cultivos de MAP, correspondientes a los grupos B, C, D y E. El número de camadas infectadas fue de 5/5; 4/7; 4/5 y 5/5, para los grupos B, C, D y E, respectivamente. Para el cálculo de positivos en "nacidos totales" y "día 21" se tuvieron en cuenta los aislamientos realizados a partir de suero, órganos y MAP; el "día 0" solo incluye aislamientos a partir de muestras de suero. Existieron Los porcentajes de los grupos en cada categoría fue estadísticamente diferente ( $p < 0,01$ ).

Tabla 23. Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y órganos obtenidas de los lechones de los grupos B,C, D y E.

Grupo	Nº de cerda	Total nacidos	Nacido muerto		Nacidos vivos - d'as de toma de muestra					Bajas en lactación	Lechones destetados
			momias II	normal	0	4	8	15	21		
B	5	13/14 <sup>a</sup>	1/2	- <sup>b</sup>	12/12	9/9	4/4	2/2	1/1	11/11	1/1
B	6	4/5	1/2	-	3/3	1/1	1/1	1/1	-	3/3	-
B	7	10/10	5/5	1/1	4/4	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
B	8	9/14 <sup>c</sup>	4/4	0/3	5/5	5/5	1/2	-	-	5/5	-
B	9	9/10	3/3	0/1	6/6	5/5	5/5	2/4	4/4	2/2	4/4
C	10	2/14 <sup>d</sup>	1/1	-	1/11	1/11	1/11	0/10	0/10	1/3	0/10
C	11	0/13	-	-	0/11 <sup>f</sup>	0/11	0/11	0/11	0/11	0/1	0/11
C	12	0/11	-	-	0/10 <sup>g</sup>	0/9	0/8	0/8	0/8	0/3	0/8
C	13	4/8	1/1	-	3/7	0/7	0/7	1/7	0/6	1/1	2/6
C	14	1/10	-	1/1	0/9	0/8	0/8	0/8	0/8	0/1	0/8
C	15	0/11	-	-	0/11	0/11	0/11	0/10	0/10	0/1	0/10
C	16	1/10	1/2	-	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	-	0/8
D	17	0/14	-	-	0/14	0/13	0/11	0/11	0/11	0/3	0/11
D	18	6/11	-	-	4/11	0/8	0/8	2/8	0/8	2/3	4/8
D	19	1/11	-	0/1	1/10	0/9	0/9	0/9	0/9	1/1	0/9
D	20	4/10	-	-	4/9 <sup>h</sup>	1/8	2/8	0/8	0/8	1/2	3/8
D	21	7/10	1/2	-	3/8	6/6	6/6	6/6	6/6	0/2	6/6
E	22	8/10	3/3	1/1	4/6	3/5	2/5	3/5	1/5	0/1	4/5
E	23	10/14 <sup>e</sup>	0/3	-	7/10	8/10	6/6	6/6	6/6		6/6
E	24	9/14	2/7	-	6/7	6/6	5/5	5/5	4/5	2/2	5/5
E	25	6/8	-	0/2	6/6	6/6	6/6	6/6	5/5	1/1	5/5
E	26	3/5	1/1	0/2	2/2	-	-	-	-	2/2	-

\*: aislamiento vírico a partir de muestras de —rganos, suero y MAP.

a: lechones positivos / lechones analizados; b: ausencia de individuos en la categoría

c, d, e: incluyen 2; 1 y 1 fetos momificados tipo I, respectivamente

f,g: no incluye un lechón que no fue sangrado

En cuanto a los lechones nacidos muertos, no fue posible realizar el aislamiento vírico a partir de los fetos momificados tipo I, debido al estado de deshidratación y maceración que presentaron. En las momias tipo II, se rescató el virus en un 66,7% de los casos. Mientras que entre los lechones nacidos muertos de aspecto normal hubo un 18,7% de positivos.

En los lechones nacidos vivos, el VSRRP se aisló en un alto porcentaje de individuos de las camadas de los grupos B y E. En el grupo C (AmervacPRRS®), se observó viremia en el día 0 con un 9,1% y un 42,8% de lechones positivos en las cerdas número 10 y 13, respectivamente. En las 4 camadas infectadas del grupo D (Pyrsvac-183®), el porcentaje de lechones virémicos en el día 0 estuvo comprendido entre un 10% y un 44%.

En el suero del día 21, los lechones del grupo B fueron todos positivos. Las dos camadas del grupo C que presentaron viremia en el día 0, fueron negativas al aislamiento del VSRRP en el suero del día 21. No obstante en un lechón de la hembra número 13 el virus se aisló a partir de una muestra de MAP. En el grupo D, 3 de las 4 camadas virémicas en el día 0, dejaron de serlo en el día 21, mientras que aquella correspondiente a la hembra 21 pasó de un 37,5% de lechones positivos en el día 0, a un 100% en el momento del destete. En este grupo, también pudo aislarse el virus en una mayor proporción, comparado con la muestras de suero, a partir de muestras de MAP y órganos, dando positivas de esta forma 3 camadas. Dentro del grupo E (Cybue®), todas las camadas mantuvieron los altos porcentajes de positividad en el momento del destete, tanto en muestras de suero como de órganos y MAP. La única excepción fue la descendencia de la hembra número 22, donde las viremias disminuyeron hacia el momento del destete, sin embargo el virus pudo detectarse en casi todos los lechones a partir de las muestras recogidas a la necropsia (tabla 23).

En los lechones positivos al aislamiento vírico, el VSRRP se halló en un 41,1% de las muestras de MAP y en menor medida de las muestras de pulmón, amígdalas, GLRF. y demás órganos (figura 24).

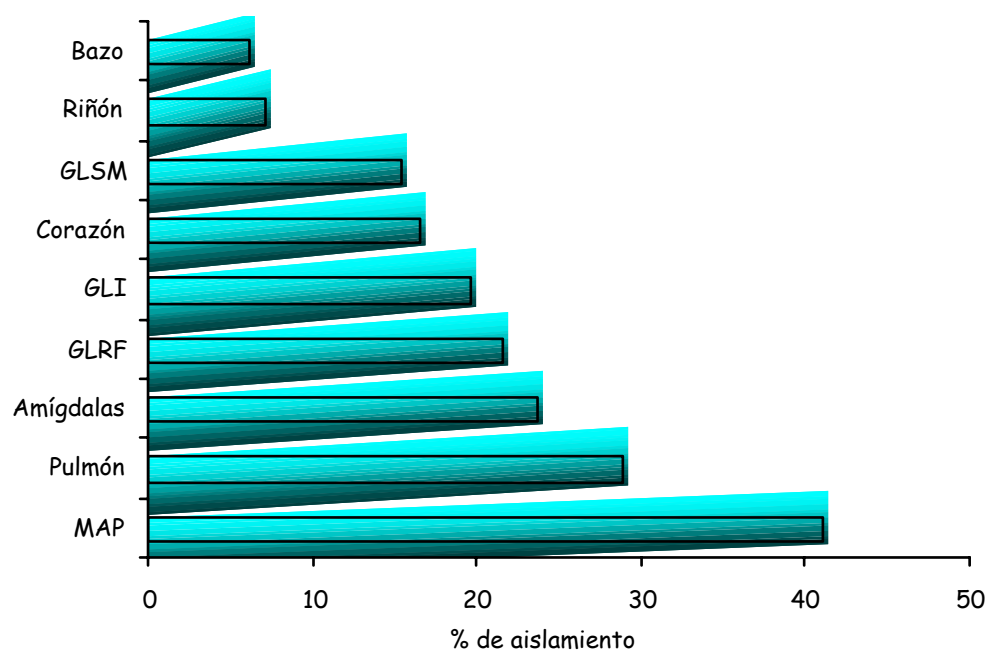


Figura 24. Porcentaje de muestras con aislamiento positivo del VSRRP, en los lechones infectados nacidos vivos.

GLRF: ganglio linfático retrofaríngeo; GLI: ganglio linfático inguinal; GLSM: ganglio linfático submandibular.



#### **4.2.2. Discusión**

El avance en el conocimiento sobre el VSRRP y su comportamiento epidemiológico dentro de granjas infectadas llevó a plantear diferentes estrategias para poder controlar la enfermedad y disminuir las pérdidas económicas que ocasiona. Sin embargo, la aplicación de medidas de control como por ejemplo el destete precoz, que fue efectivo para controlar otras enfermedades infecciosas, en el caso del SRRP los resultados no fueron los esperados. Por ello, actualmente los mejores resultados en el control se están logrando a través de la combinación de ciertas medidas higiénico-sanitarias y médicas. No obstante, el control o la prevención de la infección con VSRRP en granjas es un proceso muy tedioso con variables, y a menudo impredecibles, grados de éxito.

Uno de los puntos claves en el control de esta enfermedad es conseguir una disminución de la diseminación del virus entre las cerdas reproductivas, conocido como estabilización, con lo cual se intenta prevenir la infección de los lechones antes del destete. En este sentido, las vacunas contra el VSRRP son utilizadas para inducir una respuesta inmune en la población adulta y evitar la formación de subpoblaciones seronegativas que mantienen el virus, dentro de una piara con infección crónica. Actualmente, se encuentran en el mercado vacunas atenuadas e inactivadas. Como es sabido, la primera de ellas mejora la eficacia en detrimento de la seguridad, en comparación con las vacunas inactivadas, donde la eficacia no siempre es la deseada.

Por ello uno de nuestros objetivos fue conocer el nivel de eficacia que poseen las vacunas contra el VSRRP cuando se administran en cerdas en etapa productiva.

En este sentido, nuestro trabajo estuvo orientado, fundamentalmente, a evaluar la capacidad que poseen las vacunas analizadas para prevenir el fallo reproductivo y la infección transplacentaria de los fetos, después de un desafío heterólogo con cepas virulentas del VSRRP. Por ello, el diseño experimental contempló la vacunación de los animales antes de la cubrición, siguiendo las recomendaciones halladas en la literatura existente. En tanto que el desafío con las cepas virulentas se efectuó en el día 90 de gestación, momento en el cual los fetos poseen la máxima susceptibilidad a la infección por este agente. Al margen de los parámetros arriba citados, otros factores fueron tenidos en cuenta a la hora de evaluar la eficacia, entre ellos podemos citar la inducción de la respuesta inmune y la prevención de la viremia causadas por las cepas virulentas.

#### **4.2.2.1 Signos clínicos asociados a la vacunación**

Las VA después de su aplicación en los animales indujeron una infección leve, que no fue acompañada de signos externos de enfermedad ni cambios significativos en la temperatura corporal. Estos resultados son similares a los obtenidos con las vacunas americanas aplicadas en verracos o cerdas (Gorcyca *et al.*, 1995b; Hesse *et al.*; 1996a,b, 1997; Christopher-Hennings *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997; Srinivasappa *et al.*, 1999).

No obstante, se produjo una reducción significativa en los leucocitos totales en estos dos grupos, llegando a provocar leucopenia en una hembra del grupo C, lo que aporta evidencia sobre la infección que produce el virus vacuna en las cerdas. En este aspecto, no existen en la literatura consultada datos sobre la evolución de los parámetros hematológicos después de la inmunización contra el VSRRP, para que podamos hacer comparaciones.

Sin embargo, en diferentes trabajos sobre patogénesis del VSRRP, se describe la inducción de una leucopenia transitoria tras la inoculación de dicho agente. De esta forma, Christianson y *et al.* (1993), cuando inocularon cerdas en la mitad de la gestación hallaron una disminución de las células blancas, principalmente en el día 7 p.i., asociada a una linfopenia entre los días 3 y 11 p.i. La leucopenia también fue descrita en lechones, asociada a linfopenia (Nielsen y Bøtner, 1997; Gajecki *et al.*, 1996). No obstante, en nuestros resultados no se aprecia un cambio significativo en las proporciones de linfocitos ni tampoco de neutrófilos.

Tal como se esperaba, por tratarse de una vacuna inactivada, las hembras del grupo E no presentaron signos clínicos de infección por el VSRRP. Algunos animales de este grupo tuvieron una reacción inflamatoria leve en el punto de administración de la vacuna, que atribuimos al adyuvante oleoso que contienen.

#### **4.2.2.2. Aislamiento del virus vacuna**

Después de la inmunización de las cerdas, el virus vacunal pudo aislarse en la línea MARC-145, a partir de la mayoría de las muestras de suero obtenidas de los animales en los grupos C y D. Por el contrario, fue imposible detectar la presencia de dicho virus cuando se utilizó como soporte cultivos de MAP. Esto nos podría estar indicando que la atenuación de las cepas vacuna es capaz de producir una alteración que se traduce, por una parte en

una pérdida de adaptación del virus a la célula diana, el MAP y por otro lado, la adquisición de la capacidad de replicar en líneas celulares establecidas, condición que no reúnen las cepas campo del subgrupo europeo.

Esta misma situación se presentó cuando se titularon las VA. en cultivos de MAP, donde exhibieron títulos del orden de 1-2 log menos, en relación al cultivo en la línea MARC-145. Resultados similares fueron descritos por Benfield *et al.* (1998) con la cepa americana del VSRRP.

En una hembra de cada grupo no se pudo detectar el virus en ninguna muestra de suero, no obstante, el número de leucocitos disminuyó alrededor de un 30%, respecto al día 0. Esta observación, muy probablemente esté asociada a la infección con el VSRRP cepa vacunal, que por otra parte quedó confirmada por la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de dichos animales recogido en el día 12 p.v.. Por lo que sospechamos que el virus vacunal se replicó en dichas hembras, causando la citada disminución del número de leucocitos y la respuesta inmune, no obstante, creemos que el virus se encontraba en una dosis baja que no permitió ser detectado a través del aislamiento vírico.

La viremia producida por cepas vacunales también fue descrita por diversos autores que emplearon las vacunas con cepa americana atenuada en animales adultos. Respecto de la vacuna elaborada por Boehringer, cuando fue administrada, tanto a hembras como macho, el virus vacuna pudo ser aislado a partir del suero fundamentalmente entre los días 3 y 7, aunque se detectaron sueros positivos hasta el día 37 p.v. (Christopher-Hennings *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1999a). Por otra parte, las pruebas de eficacia llevadas a cabo con la vacuna americana PrimePac® arrojó resultados dispares. En hembras, Hesse *et al.* (1996a,b) no pudieron aislar el virus a partir de ninguna muestra de suero, por el contrario Hutchinson *et al.* (1997) lo detectaron en el suero de 1 de los 4 verracos empleados en el estudio.

Las diferencias entre los distintos autores en cuanto a la duración del período de viremia, puede atribuirse a varios factores, tanto del virus como del hospedero y métodos utilizados. La afinidad de la cepa vírica al soporte celular utilizado, posiblemente, podría explicar el motivo por el que Christopher-Hennings *et al.* (1997) y Mengeling *et al.* (1999a) detectaron el virus hasta el día 25 y 37 p.v., respectivamente, indicando que las células MARC-145 son altamente sensibles a la infección por esta cepa. En tanto que la

sensibilidad sería menor para captar la cepa de la vacuna PrimePac® y las cepas de las vacunas europeas.

Cuando en estos animales investigamos la eliminación del virus por secreciones nasales y heces, no fue posible detectar el virus vacuna, en cultivos de MAP, después de la inmunización.

#### **4.2.2.3 Desarrollo de la Respuesta Inmune**

En los grupos C y D, donde se aplicaron las VA, fue posible detectar anticuerpos neutralizantes seguido de la vacunación, que por lo general perduraron hasta el momento del desafío con las cepas virulentas del SRRP. A partir de ese momento, se produjo una rápida y fuerte respuesta inmune secundaria. Estos resultados concuerdan, en general, con los de Gorcyca *et al.* (1997a) que identifican anticuerpos neutralizantes en el día 14 p.v, y describen una excelente respuesta inmune secundaria después de la inoculación con cepas virulentas del VSRRP, en hembras que habían sido previamente vacunadas con RespPRRS/Repro®. Por su parte, Hesse *et al.* (1996a,b), publican que la vacunación de hembras con PrimePac® induce anticuerpos neutralizantes, pero no describen la cinética de los mismos.

Por el contrario, Mengeling *et al.* (1999a), no detectaron anticuerpos neutralizantes hasta el día 37 p.v. (RespPRRS/Repro®), momento que coincidió con la aplicación de una cepa virulenta. Resultados similares fueron descritos por Jordan y Polson (2000), empleando la misma vacuna en lechones.

La ausencia de AcNt. en los individuos que recibieron la VI. coincide en parte con los resultados publicados por Osorio *et al.* (1998), quienes en similares condiciones, pero utilizando una vacuna con cepa americana, detectaron en el día 11 p.i. 2 individuos positivos (1:8 y 1:16) de un total de 4 animales. Curiosamente en este trabajo, las dos VA americanas que utilizaron estuvieron casi en el mismo nivel de respuesta inmune medida por AcNt. que la VI.

Estudios de inmunidad contra el VSRRP realizados en lechones, reflejan un amplio rango de variación en los resultados obtenidos. Por su parte, Yoon *et al.* (1995) detectan AcNt. a partir del día 9 p.i., en el día 28 el 100% de los individuos son positivos, alcanzando

el nivel máximo de producción entre los días 63 y 77 p.i., con títulos individuales  $\geq 1:64$ . En nuestros resultados, el pico se produjo un poco antes, entre los días 36 y 50 p.v. y los títulos predominantes fueron de 1:8 y 1:16. A nuestro entender, el mayor título hallado por estos autores podría estar originado por el empleo de cepas virulentas y no atenuadas como lo fue en nuestro caso. Otro factor a tener en cuenta es la vía de inoculación, dado que los citados autores, además de utilizar cepas virulentas las aplican por la vía intranasal. Sumado a ello, hay que considerar que ambos estudios utilizan grupos etarios diferentes, lo que puede influir en el desarrollo de la respuesta inmune.

Otra causa importante, que sin duda contribuye a la disparidad de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos, es la metodología utilizada en cada caso. En este sentido, cabe destacar que no existe un protocolo normalizado a nivel internacional, lo que implica, por ejemplo, que una misma muestra de suero pueda arrojar resultados diferentes en distintos laboratorios. Dentro de las variables a tener en cuenta, tenemos el tipo de virus utilizado. Como ya se mencionó existe una gran variabilidad antigénica entre cepas, que pueden llevar a un reconocimiento parcial o total por parte del anticuerpo específico. Nosotros utilizamos como antígeno en la seroneutralización la cepa 5710 del VSRRP, que está estrechamente ligada a la cepa de la vacuna administrada al grupo C (AmervacPRRS®), por lo que habría sido aceptable que en este grupo se hubieran captado más eficazmente los AcNt. que por ejemplo en el grupo D. Sin embargo esta situación no parece tener cabida, puesto que los grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores medios. Posiblemente, esto podría deberse a que dichas cepas no son tan distantes genética y antigénicamente. Por otra parte, creemos que la ausencia de AcNt. en el grupo E obedece fundamentalmente, a una falta de capacidad del inmunógeno para inducir tales anticuerpos y no simplemente a un problema de sensibilidad de la técnica empleada.

Los resultados obtenidos empleando la técnica de ELISA mostraron sueros positivos a partir del día 5 p.v., si bien la mayoría de los animales lo fueron en el día 12 en los grupos C y D y en el día 20 en los animales del grupo E. Estos resultados coinciden con la observación de Christopher-Hennings (1997) de un 60% de verracos positivos por la técnica de ELISA, en el día 11 posterior a la aplicación de la VA de Boehringer. Por el contrario, en los trabajos de Osorio *et al.* (1998) los anticuerpos se detectan más tardíamente; y curiosamente, el grupo que recibió la vacuna inactivada presentó el mayor número de animales positivos en el ELISA. Por otra parte, el título de anticuerpos detectados mediante la técnica de ELISA, no parecen tener una alta correlación con el

determinado mediante seroneutralización. Esto queda de manifiesto, sobretodo, en el grupo E donde ningún animal después de la vacunación fue positivo por seroneutralización y todos tuvieron títulos  $\geq 1:200$  por la técnica de ELISA

#### 4.2.2.4 Signos clínicos después del desafío

Después de la inoculación con las cepas virulentas del SRRP, se observaron signos clínicos que fueron más acentuados en los animales del grupo control infectado que en las cerdas vacunadas. Dentro del grupo B, los signos se presentaron en la mayoría de los animales aparecieron siempre después del día 2 p.i. y fueron de corta duración. Dichos signos.. Esto coincide con la sintomatología descrita por otros autores en relación a las cepas americanas (Blackburn, 1991; Loula, 1991; Gordon, 1992), mientras que con cepas europeas, se han descrito alteraciones puntuales y esporádicas del apetito y signos de depresión (Prieto *et al.*, 1996c, 1997 a,b). Por otro lado, la coloración cianótica en piel, del pabellón auricular principalmente, se observó en dos animales. Esto discrepa con lo hallado por otros autores, que describieron su presencia de forma muy esporádica y en un bajo porcentaje de animales (raramente supera el 5%) (de Jong *et al.*, 1991; Prieto *et al.*, 1996c, 1997a,b). La presentación de estos signos parece tener un fuerte componente de respuesta individual, ya que animales que reciben dosis similares de las mismas cepas pueden no manifestar signos, como es el caso de la hembra número 8, o bien dar lugar a una sintomatología muy notoria como en el animal número 7.

En contraposición, la aplicación de las vacunas parece tener un efecto protector, disminuyendo la aparición de signos clínicos después del desafío con cepas virulentas. En estos grupos la sintomatología observada quedó prácticamente limitada a un transitorio trastorno del apetito y depresión en unos pocos animales.

La temperatura rectal media subió después de la inoculación del virus desafío, sin embargo fue mucho más significativa entre los individuos del grupo B, si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa, debido fundamentalmente a la gran dispersión de los datos observada en este grupo. A pesar de ello, solamente 3 animales alcanzaron temperaturas febriles, pertenecientes a los grupos B, C y D. Estos datos concuerdan con la mayoría de los autores que sostienen que la infección con el VSRRP produce una elevación de la temperatura que afecta a menos del 30% de los individuos, y rara vez supera los 40°C, aunque puede llegar a los 41°C (Blackburn, 1991; Loula, 1991; Gordon, 1992, Prieto

*et al.*, 1996c, 1997a.b). Por otra parte, el prolongado período febril del animal número 7 del grupo B (días 7 a 13 p.i.) acompañado de una fuerte signología clínica podría estar indicando una mayor predisposición de este individuo al VSRRP.

En el grupo C (AmervacPRRS®) la temperatura rectal media en los distintos momentos p.i. presentaron diferencias estadísticas respecto del momento previo. Nosotros sospechamos que dichas variaciones pueden atribuirse a factores propios del individuo o del ambiente y que en el momento denominado *post1* (días 1 a 5 p.i.), además puede estar ejerciendo influencia la infección producida por el VSRRP. En el grupo D no se observan cambios significativos a través del tiempo. Este último dato coincide con los descritos por otros autores que emplearon vacunas americanas en animales adultos (Gorcyca *et al.*, 1996; Hesse *et al.*, 1996a; Hutchinson *et al.*, 1997; Srinivasappa *et al.*, 1999).

El análisis hematológico reveló una disminución en el recuento de glóbulos blancos en todos los grupos inoculados. Sin embargo la leucopenia en el sentido estricto afectó a la mayoría de los animales de los grupos control infectado y vacunado con Cyblue® (B y E) en los días 3 y 5 p.i., mientras que en los grupos C y D, tanto el número de animales infectados como la duración de este signo fueron inferiores a los otros dos grupos.

En los animales vacunados no se produjo una linfopenia tan marcada como en el grupo B y por otra parte en los grupos C y D los cambios que se produjeron no fueron estadísticamente significativos, a excepción de la neutropenia del día 9 en el grupo C. El análisis de estos valores de forma individual permite comprobar que la reducción ocurrió de forma muy acentuada en la mayoría de los animales. Nosotros desconocemos el motivo de esta respuesta, y por otra parte no hemos encontrado ninguna publicación que refleje una situación similar.

Por el contrario, los animales que recibieron la VI. respondieron con linfopenia y neutrofilia, comportándose de igual forma que el grupo control infectado (B).

Estos datos difieren de los presentados por Christopher-Hennings *et al.* (1997) que no hallaron diferencias significativas en el total de células blancas de verracos vacunados con Resp/PRRS MLV® y controles, en tanto que describen una linfopenia y neutrofilia después de la exposición al VSRRP. Gorcyca *et al.* (1997b), en los estudios de eficacia de la vacuna RespPRRS/Repro™, describen una disminución de los leucocitos en los grupos de animales no vacunados e infectados, de alrededor de un 33%, después del desafío con

cepas virulentas. Mientras que en los animales vacunados no se producen alteraciones significativas después de la inoculación. En este punto, en vista de los resultados obtenidos por Gorcyca *et al.* (1997) y Christopher-Hennings *et al.* (1997) con la vacuna americana, creemos que las cepas europeas se comportan de manera diferente a aquellas, ya que inducen leucopenia, pero desconocemos los motivos para que ello suceda..

#### **4.2.2.5 Aislamiento del VSRRP, cepas virulentas**

Después de la inoculación con las cepas virulentas, el virus pudo aislarse hasta el día 12 p.i. y 9 p.i., en los individuos de los grupo B y E, respectivamente. Mientras que en los grupos C y D (AmervacPRRS® y Pyrsvac-183®, respectivamente), la viremia afectó a un número menor animales y de forma muy breve. Por tanto, la aplicación de las VA, tiene un efecto positivo al acortar el período de circulación del VSRRP en sangre y disminuyendo por tanto las posibilidades de su eliminación.

Estos datos coinciden con los publicados sobre las VA americanas, por Christopher-Hennings *et al.* (1997), Mengeling *et al.* (1999a). No obstante, otros autores no describen períodos virémicos después de la inoculación de VSRRP en animales vacunados (Hesse *et al.*, 1996a,b; Gorcyca *et al.*, 1997a,b; Osorio *et al.*, 1998). Estos últimos resultados implican a ambas vacunas americanas y el diseño experimental empleado es similar al adoptado por nosotros, tanto en el esquema de vacunación-desfío como en las DI<sub>50</sub>CT utilizadas para la inoculación intranasal.

Evidentemente, tal como se mencionó precedentemente, la duración de la viremia puede estar influida por varios factores. Uno de ellos es la cantidad de virus a la que son expuestos los animales. Mediante el análisis de la literatura se pudo comprobar que, en todos los trabajos arriba citados, el inóculo vírico que utilizaron contenía alrededor de 10<sup>6</sup> DI<sub>50</sub>CT, por lo tanto este factor no ayudaría, en este caso, a explicar las diferencias observadas. Por otra parte, se podría asumir que cuanto mayor similitud exista entre la cepa vacunal y la utilizada al desafío, menor sería la viremia después de la inoculación. No obstante, este factor no parece tener mucha implicación, puesto que por ejemplo, en el trabajo de Osorio *et al.* (1998), utilizan para el desafío una cepa heteróloga altamente virulenta aislada de casos "atípicos" de SRRP y no recuperan el virus a partir del suero de los animales. Por lo tanto, estas discrepancias podrían explicarse a través del factor individuo o bien por la sensibilidad de las técnicas empleadas en la detección del virus.



La vacuna inactivada, no es tan eficaz para acortar el período de viremia después del desafío con cepas virulentas. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Osorio *et al.* (1998). En nuestro estudio la viremia se detectó hasta el día 9 p.i., en tanto que Plana Durán *et al.* (1997b) y Christensen *et al.* (1998) describen aislamientos positivos incluso en el día 15 p.i. En el primero de estos trabajos el desafío se hizo con una cepa homóloga a razón de  $10^{5.6}$  DI<sub>50</sub>CT por individuo y el aislamiento se realizó en cultivos de MAP. La diferencia principal entre este trabajo y el nuestro radica en que mientras nosotros utilizamos una doble vacunación, Plana Durán *et al.* aplican una sola vacuna al principio de la gestación. Quizás este hecho podría reflejar que la vacunación simple no es tan efectiva en acortar la duración de la viremia como cuando se emplean dos dosis. No obstante, hay que tener en cuenta también que, en el grupo de animales control infectado, estos autores tuvieron un mayor porcentaje de individuos positivos en el día 15 p.i. que nosotros. Por tanto, nosotros podríamos explicar estas discrepancias por medio de las diferencias entre las cepas virulentas utilizadas, la dosis infectiva de virus circulante en el suero de los animales o simplemente a la sensibilidad de los macrófagos empleados para realizar el aislamiento del virus.

En un trabajo de Joo *et al.* (1998) realizado en hembras pertenecientes a una granja positiva al VSRRP, e inoculadas con cepas virulentas, sugieren que cerdas con niveles detectables de AcNt. podrían estar protegidas contra una viremia. En nuestro trabajo, el mayor período de viremia después de la inoculación con las cepas virulentas se presentó en el grupo control infectado, donde los animales eran seronegativos. En el grupo E (Cyblue®), donde no se detectaron anticuerpos neutralizantes después de la vacunación, pero sí mediante la técnica de ELISA, la duración de la viremia fue ligeramente inferior. Por el contrario en los grupos C y D (vacunas atenuadas) donde casi todos los individuos presentaron títulos  $\geq 1:2$  de AcNt., tanto la duración como el número de animales positivos fue inferior. Ahora bien, al analizar de forma pormenorizada los animales de estos dos últimos grupos no podemos establecer una relación directa entre título de anticuerpos y presencia de virus en el suero, pero quizás se pueda determinar una tendencia. De los 6 animales virémicos, 5 tuvieron un título de AcNt. de 1:4 y en el otro animal fue de 1:2. Las tres hembras cuyo título de AcNt. en el día 90 de gestación fue de 1:8 no fueron viremicas. No obstante, la hembra número 21 tampoco fue virémica pero el título de AcNt. fue inferior a 2. Por tanto, asumimos que a nivel de grupo, la presencia de AcNt. confiere cierta protección frente a la viremia.

Además, existe otro factor implicado, el sistema ADE, que relaciona el nivel de AcNt. y la inducción de viremia. Diversos autores han demostrado, tanto *in vitro* (Choi *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1996) como *in vivo* (Christianson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1997), una amplificación de la replicación vírica en presencia de dosis subneutralizantes de anticuerpos IgG específicos frente al VSRRP. Por otra parte, Yoon *et al.* (1996, 1997) sugieren a partir de sus observaciones, que los anticuerpos inducidos por la vacunación podrían mejorar la replicación de cepas virulentas en animales vacunados. De esta forma, observaron que la actividad ADE estuvo presente cuando los títulos de AcNt. contra el VSRRP caía por debajo de 1:3. Nuestros resultados no parecen avalar tal teoría, puesto que como ya se mencionó, las viremias fueron menos severas en los animales que recibieron las VA en comparación con el grupo B y E, donde no se detectaron dichos anticuerpos. Ahora bien, dentro de los grupos C y D, aparentemente, los individuos que poseían títulos neutralizantes más bajos presentaron viremias, aunque hubo excepciones. Por lo tanto, creemos que con nuestros resultados no se puede establecer categóricamente la implicación que tiene el sistema ADE, fundamentalmente en cuanto al nivel de viremia de los animales. En este sentido, Yoon *et al.* (1997) apuntan a la existencia de diferentes susceptibilidades del sistema ADE en función del tipo de cepa considerada.

El aislamiento del virus a partir de hisopos nasales obtenidos después del desafío fue más productivo entre los animales del grupo B (control infectado). Sin embargo, también se detectaron muestras positivas en los grupos C y E, aunque en un bajo número de individuos. En todos los casos los títulos obtenidos siempre fueron muy bajos (<10 DI<sub>50</sub>CT).

La literatura existente sobre este aspecto está prácticamente restringida a los estudios de patogenia y vías de eliminación del VSRRP en animales inoculados experimentalmente, sin antecedentes de vacunación. A través de ellos se conoce que después de la infección, el virus se puede eliminar por distintas vías, tales como secreciones nasales y prepuciales, saliva, orina, heces y semen (Edwards *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a, 1996; Prieto *et al.*, 1996a,c, 1997a; Teuffert *et al.*, 1998). Bajo nuestras condiciones experimentales, se podría decir que la vacuna Pyrsvac-183<sup>®</sup> previene la diseminación del virus a través de secreciones nasales y heces, después del desafío, en tanto que el inmunógeno Amervac SRRP<sup>®</sup> y Cyblue<sup>®</sup> disminuyen el número de animales eliminadores y además, en la primera de ellas, el tiempo de eliminación del virus virulento, siempre en relación con los animales controles infectados.

#### 4.2.2.6 Aspectos productivos

En cuanto a la eficacia de las vacunas para prevenir las consecuencias reproductivas del SRRP, en nuestro estudio tuvimos en cuenta los distintos parámetros que pudieran verse afectados por el VSRRP. De esta forma, evaluamos los días de gestación, el número de lechones nacidos totales, vivos y muertos por cerda, el peso al nacimiento y al destete de los lechones, así como la viabilidad y la incidencia de infecciones transplacentarias.

Los partos estuvieron dentro de los límites considerados normales ( $114 \pm 3$  días), excepto para tres cerdas, de los grupos B, D y E, que parieron en los días 109 y 110 de gestación. Diversos autores señalan que durante un brote de SRRP los partos prematuros afectan entre un 5% y un 30% de las cerdas (de Jong *et al.*, 1991; Loula, 1991; Vogel *et al.*, 1991; Hopper *et al.*, 1992). Por tanto, nuestros resultados estarían dentro de los límites establecidos por los mencionados autores y los animales de los grupos D y E no presentan diferencias en cuanto al control inoculado en este sentido. Por el contrario, nuestros hallazgos difieren de los publicados por Llanos *et al.* (2000), que mediante un diseño experimental similar al nuestro con la vacuna Pyrsvac-183<sup>®</sup>, comunican que los partos sucedieron entre los días 112 y 120 de gestación, lo que muestra un período de gestación más prolongado en algunos animales.

Al analizar la viremia en nuestros animales, se puede observar que las cerdas con los partos prematuros, número 5 y 26, poseen los períodos de viremia más largos dentro de su grupo e incluso los mayores títulos del virus en suero. Por el contrario, la hembra del grupo D (Pyrsvac-183<sup>®</sup>), presentó una viremia similar a otro animal que tuvo parto normal. Y en este sentido, cabe destacar que las cerdas virémicas del grupo C tuvieron gestaciones normales en cuanto a duración. Por tanto, creemos que si bien el VSRRP puede afectar el período de gestación, dado que estas alteraciones no se produjeron dentro del grupo control sin infectar (A), no creemos que guarde relación directa con la viremia observada en las cerdas.

En cuanto a los diferentes parámetros productivos, no se observaron diferencias entre los grupos en relación al número total de lechones nacidos, lechones nacidos débiles y el peso medio del grupo en el momento del nacimiento de los lechones nacidos vivos. Estos datos coinciden plenamente con los publicados por diversos autores utilizando VA con virus americano (Hesse *et al.*, 1996a,b; Osorio *et al.*, 1998), o bien VI (Plana Duran *et al.*, 1997b).

Por el contrario, cuando se analizó el número de lechones nacidos vivos, se hallaron diferencias significativas entre los grupos. Por un lado, las VA tuvieron un comportamiento más cercano al del grupo control no infectado, mientras que los resultados obtenidos con la VI se asemejaron a los del grupo control infectado, con una baja viabilidad al nacimiento.

Dichos resultados coinciden con los obtenidos con las VA del tipo americano publicados por Gorcyca *et al.* (1997a) y Hesse *et al.* (1996a,b). Por otra parte, discrepan de los publicados por Osorio *et al.* (1998), que no encontraron diferencias en el número de lechones nacidos vivos de hembras control o vacunadas. Sin embargo, estos autores establecieron tres niveles diferentes cuando analizaron la viabilidad media de los grupos al momento del nacimiento. La mejor viabilidad correspondió al grupo control sin infectar, le siguieron los grupos que recibieron VA y por último el control infectado y el grupo inmunizado con VI, que no difirieron entre sí.

Asimismo, nuestros resultados discrepan con lo publicado por Plana Durán *et al.* (1997b), que describen un comportamiento significativamente mejor en el grupo vacunado con VI en relación al grupo que sólo recibió el virus desafío. Nosotros creemos que estas discrepancias pueden atribuirse principalmente a las diferencias en el diseño experimental utilizado. Estos autores emplean un modelo de desafío homólogo, utilizando el mismo virus en el momento de la vacunación y de la inoculación, obviamente inactivado en el primero de ellos. Otro factor que podría estar influyendo, aunque creemos que en menor medida, es el momento en que producen la vacunación y el desafío. En muchos animales el período transcurrido entre la vacunación y el desafío es menor que en nuestro trabajo, lo que podría dar lugar a que dichos animales estuviesen aún en el pico de la respuesta inmunitaria y por tanto mejor protegidos. Paralelamente, el desafío en muchos individuos se realizó entre los días 65 y 80 de gestación, y si bien es dentro de último tercio de gestación, está descrita una menor incidencia de infección transplacentaria cuando la exposición al virus se realiza antes de los 72 días de gestación (Mengeling *et al.*, 1994).

En relación a la media de lechones nacidos débiles por grupo, nuestros resultados coinciden con los de Plana Duran *et al.* (1997b) pero discrepan de los de Hesse *et al.* (1996a,b), quienes encuentran una disminución significativa de estos lechones dentro del grupo vacunado.

En el grupo control no infectado también se hallaron lechones nacidos débiles, lo que nos lleva a pensar que su presencia no está únicamente ligada a la infección por el VSRRP. Un factor que podría favorecer la aparición de lechones de bajo peso es el número animales que forma la camada. Sin embargo, en nuestros resultados no fue posible establecer una relación directa entre tamaño grande de la camada y la presencia de estos lechones.

Respecto al número de lechones nacidos muertos, existieron diferencias significativas entre los grupos control y los que recibieron las VA en relación al control infectado y la VI. Los valores de lechones nacidos muertos obtenidos en los grupos B y E recuerdan a los publicados por de Jong *et al.* (1991), Loula (1991) y Hopper *et al.* (1992) en la descripción de diferentes brotes de SRRP. Las VA marcan una clara diferencia con respecto al grupo control infectado, lo que sugiere un claro beneficio en favor de estos productos.

A partir de nuestras observaciones se puede deducir que las vacunas atenuadas reducen significativamente la presentación de los fetos momificados tipo II, en tanto que la VI prácticamente se comporta de igual forma que en los animales no inmunizados e infectados. Estos resultados concuerdan con los descritos en el caso de los inmunógenos americanos, donde su aplicación reduce drásticamente la presentación de las momias tipo II (Hesse *et al.*, 1996a,b; Gorcyca *et al.*, 1997a,b).

Los lechones nacidos muertos normales se presentaron en un porcentaje levemente superior en los grupos B y E, en relación al resto, sin llegar a marcar diferencias estadísticamente significativas. Esto podría obedecer a un proceso de muerte fetal desencadenado por el virus pero que no dio el tiempo suficiente para producir la decoloración y maceración de los fetos y que puedan ser considerados como fetos momificados tipo II. No obstante, dado que no existe evidencia estadística se asume que la presencia de estos fetos es independiente de la infección con el VSRRP.

La morbilidad y mortalidad de los lechones en lactación es una de las principales características de la enfermedad. En este sentido, la aplicación de las VA son mucho más efectivas que la VI para mejorar estos aspectos, no obstante esta última vacuna tiene un comportamiento sensiblemente mejor en relación al grupo no inmunizado y desafiado. Estos resultados concuerdan con los hallados por Hesse *et al.* (1996a,b) y Gorcyca *et al.* (1997b) con la VA americana. Por su parte, Osorio *et al.* (1998) encuentran diferencias entre los lechones destetados en los diferentes grupos pero no describen diferencias entre

el comportamiento de la VI y el grupo control infectado. Nosotros no sabemos exactamente que diferencias existen entre ambas VI. que lleven a obtener estos resultados dispares.

En relación a las causas de bajas durante la lactación, es importante hacer hincapié con lo sucedido en el grupo control infectado en relación al resto de los grupos. De esta forma evidenciamos que los lechones nacidos de madres vacunadas no tienen una tasa de mortalidad por causas infecciosas tan altas como en el grupo control infectado. En este grupo, las bajas se produjeron principalmente como consecuencia de una diarrea persistente con debilitamiento y muerte o bien por pericarditis o peritonitis. Diversos autores describen una asociación entre la infección por el VSRRP y la presencia de diarrea acuosa que no responde al tratamiento con antibióticos (Gordon, 1992; Hopper *et al.*, 1992; White *et al.*, 1992a). Posiblemente esta asociación pueda atribuirse a una depresión general del sistema inmunitario, sin embargo no hay una confirmación en este sentido (Drew, 2000) y los resultados obtenidos apuntan más bien a una inmunomodulación a nivel local del pulmón como consecuencia de la replicación del virus en los MAP (Wensvoort *et al.*, 1991; Pol and Wagenaar, 1992; Drew, 2000). Al margen de la influencia que el VSRRP pueda ejercer en el sistema inmune, nosotros creemos que la alta incidencia de diarreas en los lechones del grupo B, posiblemente esté asociada con la falta de vigor que poseen dichos animales, que los llevo a realizar un consumo insuficiente de calostro y leche, facilitando de esta forma la aparición de infecciones secundarias.

La importancia que tiene en nuestro estudio la muerte de lechones por aplastamiento puede obedecer al empleo de cerdas primerizas, donde está descrito un porcentaje más elevado de este tipo de baja en relación a la presente en cerdas multíparas.

En relación al peso de los lechones no se observó ninguna influencia del VSRRP. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos por Gorcyca *et al.* (1997b) y Mengeling *et al.* (1996b) en las pruebas de eficacia de la vacuna americana. Por otro lado, las VA, según nuestros resultados, evitan el efecto negativo que posee el VSRRP en referencia al incremento de peso y por tanto del peso al destete de los lechones infectados, en relación al grupo control infectado. Mientras que el efecto de la VI, está en una posición intermedia, mejorando en parte los malos rendimientos productivos obtenidos en el grupo B. Estos datos concuerdan con los presentados por Mengeling *et al.* (1996b) y Gorcyca *et al.* (1997b) en sus trabajos con vacunas americanas.

Por otro lado, cabe mencionar que dentro de los grupos B y E, las camadas que presentaron mejores rendimientos en cuanto a la ganancia de peso y peso al destete - hembras número 9 y 25, respectivamente-, correspondieron a las hembras que tuvieron períodos de viremia más cortos después de la inoculación con el VSRRP y la viabilidad al destete más alta, dentro de su grupo,. No obstante, a nuestro entender estos datos no son suficientes para poder hacer una inferencia generalización, aunque pueden dar una orientación.

#### **4.2.2.7 Infección transplacentaria**

Quizás uno de los aspectos más importantes en la evaluación de la eficacia de las vacunas es valorar la capacidad que poseen para prevenir las infecciones congénitas después del desafío con cepas virulentas.

En este aspecto, ninguna de las vacunas fue capaz de impedir que las cepas virulentas del VSRRP infecte a los fetos, no obstante, las VA disminuyen la probabilidad de infección transplacentaria y la incidencia de lechones infectados.

A juzgar por nuestros resultados, la VA AmervacSRRP® brinda una mayor protección en este sentido, dado que 3 de las 7 camadas estuvieron infectadas, con un 10,4% de lechones nacidos con el virus y un 3,3 % de lechones destetados positivos. En tanto que en el grupo que recibió la VA Pyrsvac-183®, las camadas infectadas fueron la mayoría (4 de 5) y los porcentajes de lechones positivos estuvieron alrededor del 30% en todo momento.

En general estos resultados son similares a los aportados por Hesse *et al.* (1996b) y Mengeling *et al.* (1999a), empleando las vacunas americanas Prime Pac PRRS® y RespPRRS®, respectivamente. No obstante, estos autores describen cifras de lechones positivos inferiores a las nuestras, tanto en los grupos vacunados como en los controles infectados. Estas discrepancias podrían atribuirse a una diferencia en el grado de virulencia de las cepas utilizadas.

En contraposición a estos resultados, Gorcyca *et al.* (1997a), Llanos *et al.* (2000), así como Hesse *et al.* (1996a) cuando realizan un desafío con cepas del VSRRP homólogas, no hallaron lechones infectados procedentes de las hembras vacunadas con RespPRRS®, PYRSVAC® y Prime Pac PRRS®, respectivamente. En este sentido, lo que más nos llama

la atención es la discrepancia con los resultados publicados por Llanos *et al.* (2000), dado que nosotros utilizando la misma vacuna bajo circunstancias similares obtuvimos un 32,1% de lechones infectados. Una posible explicación a ello podría encontrarse en el sistema de detección del virus. Mientras dichos autores utilizan la línea MARC-145, nosotros realizamos los aislamientos en cultivos de MAP, y es de esperar que estos últimos posean una permisibilidad mayor a la infección por cepas europeas virulentas del VSRRP, que la línea celular.

Si analizamos de forma individual lo acontecido en estos dos grupos, podemos comprobar que dentro del grupo C (AmervacPRRS®), todas las cerdas que presentaron infección transplacentaria fueron virémicas después de la inoculación experimental y tuvieron un título de AcNt. de 1:4 al momento del desafío. En tanto que en el grupo D (Pyrsvac-183®), la única cerda donde no se detectaron lechones infectados fue la número 17, que presentó un título de AcNt de 1:8 y no fue virémica. El resto de los animales de este grupo tuvo títulos de AcNt.  $\leq 1:4$  y dos de ellas fueron virémicas. Dentro de este grupo hay que hacer mención especial a la hembra número 21, donde el porcentaje de lechones infectados no disminuyó a través del tiempo, tal como ocurrió con las otras camadas infectadas de los grupos C y D. Este animal no presentó viremia posterior a la inoculación con las cepas virulentas del VSRRP, pero curiosamente el título de AcNt. fue  $< 1:2$  en el día 90 de gestación, si bien luego tuvo una respuesta similar al resto de los animales de este grupo. Nosotros desconocemos la causa del alto porcentaje de lechones infectados en esta cerda a través del tiempo.

En conclusión, creemos que estas dos VA no aseguran una protección completa frente a una exposición a cepas virulentas heterólogas del VSRRP. Esta situación permitiría que se produjera un determinado porcentaje de infecciones transplacentarias que asegurarían la transmisión vertical de cepas virulentas y por tanto su perpetuación en una piara vacunada. Por tanto, creemos que cualquier plan de control o erradicación del VSRRP basado únicamente en la vacunación de los animales tiene pocas probabilidades de ser efectivo.

Por otra parte, en el grupo control infectado y en el grupo de la VI, todas las camadas estuvieron infectadas y con un alto número de lechones positivos a través del tiempo. En las hembras de estos grupos no se detectaron Ac Nt y fueron virémicas después del desafío. En este sentido, no existen diferencias entre el hecho de inmunizar a las hembras en el



momento previo a la cubrición con una VI y no hacerlo, dado que la diseminación del virus por la camada no difiere.

Con lo expuesto hasta aquí, podríamos decir que la aparición conjunta de un título de AcNt.  $\geq 1:2$  y la ausencia de viremia posterior a la inoculación de las cepas virulentas del VSRRP disminuyen la probabilidad de infección transplacentaria con dicho virus.

Como ya se mencionara, los fetos momificados tipo II parecen estar relacionados directamente con la infección por el VSRRP, sin embargo solamente un 66,7% de estos fetos fueron positivos a la presencia del virus. Estos resultados concuerdan con los citados por otros autores, quienes incluso obtienen un menor porcentaje de aislamiento del virus entre estos fetos (Christianson *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1996b; Mengeling *et al.*, 1999a). Estos bajos porcentajes de positividad podrían reflejar una inactivación del virus después de la muerte fetal *in útero*, y no la incidencia real de infección. En este aspecto, Mengeling *et al.* (1996b) postulan que la mayoría de estos fetos sufren infección congénita y mueren a consecuencia de ello.

Un hecho que llama la atención es la aparición dentro del grupo C de dos camadas donde los aislamientos del virus solo fueron positivos en los lechones nacidos muertos (hembras número 15 y 16), en ausencia de otros individuos de la misma camada infectados. Posiblemente este hecho pueda atribuirse a i) bajo determinadas circunstancias, solamente se hayan infectado los lechones que murieron, o bien, a ii) la existencia en la camada de otros lechones infectados con el VSRRP, pero con bajos niveles de virus circulante, que no permitan detectarlos mediante el aislamiento vírico en MAP. Al respecto, cabe mencionar las observaciones de Mengeling *et al.* (1999a) sobre la interferencia que pueden causar los anticuerpos maternos con el aislamiento del virus en los lechones. No obstante, estos autores refieren al caso de una cepa de VSRRP homóloga a la que produjo los anticuerpos. En nuestra opinión, esto es más difícil que ocurra bajo nuestras condiciones experimentales, donde se utilizaron cepas heterólogas para el desafío. Por lo tanto, nosotros no sabemos las circunstancias exactas que concurrieron para que este hecho tenga lugar.

Otro aspecto importante que contribuye a la eficacia de las vacunas es su capacidad en disminuir la presencia de lechones persistentemente infectados. En este sentido, la aplicación de las VA realizada en las hembras parece tener un efecto positivo para reducir, tanto el número de animales con infección transplacentaria, como la presencia de lechones positivos en el momento del destete. De esta forma, los datos más alentadores

se obtuvieron en el grupo C (AmervacPRRS®), donde ya en el día 15 no se detectaron muestras de suero positivos, no obstante al sacrificio de los animales se detectó una muestra de MAP positiva. Mientras que en el grupo D, de un 32,1% de lechones infectados en el día 0 se pasó a un 30,9% en el momento del destete. En los grupos B y E el porcentaje de lechones positivos aumentó conforme pasó el tiempo para rondar el 100% en el día del destete, poniendo de manifiesto la escasa eficacia de la VI en este sentido-

Los resultados hallados en los grupos B y C coinciden con los trabajos llevados a cabo por Benfield *et al.* (1997), donde el 100% de los lechones nacidos vivos de cerdas infectadas alrededor del día 90 de gestación y que sobrevivieron a los 21 días de edad, llegaron a ser persistentemente infectados. Estos lechones pueden tener una apariencia totalmente normal, aunque se comporten como una fuente de eliminación del VSRRP, perpetuando la infección en la granja (Mengeling *et al.*, 1994; Benfield *et al.*, 1997).

En este sentido, la VA. Amervac SRRP®, tiene un mejor potencial que PYRSVAC-183® para minimizar la población de animales persistentemente infectados y por tanto la dispersión del virus dentro de la población.

Las muestras de pulmón, amígdalas, GLRF. y GLI, obtenidas de los lechones muertos durante la lactación o bien sacrificados a los 21 días de vida, son las que presentaron los mayores niveles de positividad. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Mengeling *et al.* (1995), Rossow *et al.* (1995, 1996) y Halbur *et al.* (1996b), realizando infecciones experimentales en lechones.

Por otra parte, en los grupos que recibieron las VA se observó un mayor número de lechones con AcNt en el día 0, en relación al grupo control no vacunado y el grupo que recibió la VI. Estas diferencias también se observaron en el día 21 de vida de los animales. Estos datos parecen tener una relación inversa con los resultados del aislamiento de VSRRP. A igual de lo que sucede en cerdas, los AcNt podrían tener una acción protectora contra la viremia (Joo *et al.*, 1998).

En este sentido, la mayoría de los estudios serológicos están realizados en lechones destetados y experimentalmente infectados, de forma que no existe ningún trabajo realizado con animales infectados *in útero* para poder comparar directamente con nuestros resultados. Varios autores (Yoon *et al.*, 1996,1997; Shibata *et al.*, 1998) describen el funcionamiento de la actividad ADE cuando los títulos de AcNt caen debajo de 1:3. Nosotros podemos

traspolar este hallazgo a los lechones de los grupos B, E y la camada de la hembra número 21 del grupo D (Pyrsvac-183<sup>®</sup>), donde la media de AcNt fue inferior a 1:5. No obstante, este sistema no permite explicar lo sucedido en las camadas de las hembras número 13, 18 y 20, cuya título promedio está entre 1:16 y 1:32 y aparecieron lechones positivos al VSRRP, mientras que otras camadas con títulos similares o incluso algo inferiores no se observaron infecciones en los lechones destetados.

A juzgar por estos resultados, la respuesta inmune, medida por el nivel de Ac Nt no es suficiente para explicar los hechos. En este sentido, varios trabajos avalan la importancia de la inmunidad de base celular frente a la infección por el VSRRP (Choi *et al.*, 1992; Molitor *et al.*, 1997; Rossow *et al.*, 1995; Bautista y Molitor, 1997; Pirzadeh y Dea, 1998; Bautista *et al.*, 1999), y quizás cuando se profundice el conocimiento en este aspecto, puedan hallarse muchas explicaciones consideradas hasta el momento como casuales.

## **V. Conclusiones**

**A. Conclusiones que derivan del estudio de seguridad en cerdas gestantes de las cepas víricas incluidas en las vacunas AmervacPRRS® y Pyrsvac-183®.**

1. Las cepas vacunales, aplicadas vía intranasal, producen una viremia de corta duración, en ausencia de signos clínicos.

2. Las cepas VP046BIS y ALL-183 pueden atravesar la barrera placentaria e infectar a los lechones, aunque en menor grado que las cepas virulentas, cuando se inoculan en el último tercio de la gestación.

3. Las cepas vacunales inducen un porcentaje menor de animales infectados en el momento del destete, que las cepas de campo.

4. Las cepas vacunales inoculadas alrededor del día 90 de gestación poseen poco o ningún efecto sobre los datos productivos. A excepción de la cepa ALL-183 que ejerce un efecto negativo sobre el peso de los lechones, al momento del nacimiento y del destete.

**B. Conclusiones que derivan del estudio de la eficacia de las vacunas contra el VSRRP en hembras gestantes.**

1. La aplicación de las VA o VI no induce respuesta clínica, a excepción de una transitoria disminución de los glóbulos blancos producida por las VA. Las cepas del VSRRP incluidas en las VA desarrollan una viremia de corta duración.

2. Las VA estimulan la producción de AcNt. con títulos detectables hasta los 120 días p.v., momento en que se realizó el desafío con las cepas virulentas del VSRRP, dando lugar a una respuesta inmune secundaria de mayor nivel. La VI. no estimula la producción de Ac.Nt. después de la vacunación.

3. Después del desafío con las cepas virulentas del VSRRP, tanto las VA como la VI, atenúan la presentación clínica de la enfermedad. Las VA disminuyen el número de animales y la duración del período de viremia, así como la eliminación nasal de las cepas virulentas del VSRRP, siendo en este sentido el producto Pysrvac-183® más efectivo. La VI, acorta levemente el período de viremia.

4. Ninguna de las vacunas previene la infección transplacentaria. Sin embargo, las VA proveen cierta protección al disminuir el número de camadas infectadas y de lechones positivos al VSRRP, presentando mejores resultados AmervacPRRS®. La VI no parece brindar protección en este aspecto.

5. Las VA previenen el efecto negativo que ejerce el VSRRP sobre los datos de producción, mientras que la VI mejora levemente las consecuencias de la infección con el virus, aunque no alcanza los rendimientos observados con las VA y el grupo control sin infectar.

6. En las cerdas vacunadas con AmervacPRRS® y desafiadas con cepas virulentas existe un menor porcentaje de animales persistentemente infectados en el momento del destete, en comparación con Pysrvac-183®.

### **C. Conclusiones generales**

1. Las cepas atenuadas del VSRRP contenidas en las vacunas AmerVacPRRS® y Pyrsvac-183® pueden inducir infección transplacentaria y el nacimiento de lechones persistentemente infectados, en ausencia de alteraciones importantes en los datos productivos y manifestaciones clínicas, cuando se administran vía intranasal en dosis 10 veces superiores a la recomendada. Por lo tanto no poseen un 100% de seguridad.

2. Las VA poseen una mayor eficacia que la VI para prevenir las manifestaciones reproductivas del SRRP, causadas por cepas virulentas en el último tercio de la gestación. Ninguna vacuna previene la infección transplacentaria y la infección de los lechones, si bien las VA presentan una mayor eficacia en este sentido.

## **VI. Bibliografía**



- Ahl, R., M. Pensaert, I.B. Robertson, C. Terpstra, W. van der Sande, K.J. Walker, M.E. White, M. Meredith. 1992. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS or blue-eared pig disease). *Vet. Rec.*, 130: 87-89.
- Ahmed, R., L.A. Morrison, D.M. Knipe. 1996. Persistence of viruses. In: *Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al. (Eds.), Field virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA*, pp. 219-249.
- Albina, E., F. Madec, R. Cariolet, and J. Torrison. 1994a. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec* 134: 567-73.
- Albina, E., L. Piriou, E. Hutet, R. Cariolet, and L. H. R. 1998. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* 61: 49-66.
- Albina, E., P. Vannier, F. Madec, R. Cariolet, J. Torrison, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994b. Persistence of the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus in infected pigs and farm units. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.
- Albina, E., T. Baron, and Y. Leforban. 1992a. Blue-eared pig disease in Brittany. *Vety Rec.* 130: 58-59.
- Albina, E., Y. Leforban, T. Baron, and J. Plana Duran. 1992b. Blue-eared pig disease in Brittany: a new test. *Vet Rec.* 130: 83-84.
- Alno, J.P., M. Dethinne, J.M. Guillaume, P. Hamon, A. Laval, T. Long, C. Renoult, R. Roche. 2000. Field efficacy of a new killed vaccine against PRRS for breeder pigs. In: *Proceedings: The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia*.
- Alstine, W. G. v., G. W. Stevenson, C. L. Kanitz, and W. G. Van Alstine. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vety Microbiol.* 49: 3-4.
- Allende, R. L., T. L.; Lu, Z.; Rock, D. L.; Kutish, G. F.; Ali, A.; Doster, A. R.; Osorio, F. A. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J. Gen. Virol.* 80: 307-315.
- Andreyev, V. G., R. D. Wesley, W. L. Mengeling, A. C. Vorwald, and K. M. Lager. 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch.f Virol.* 142: 993-1001.
- Andreyev, V.G., A.V. Scherbakov, V.A. Pylnov, A.a. Guser, P. Cordioli, G. Sala. 2000. Genetic variations among PRRSV strains isolated in Italy and in Russia. *Vec.Rec.*, 1: 89.
- Asai, T., M. Mori, M. Okada, K. Uruno, S. Yazawa, I. Shibata. 1999. Elevated serum haptoglobulin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. and Immunopath.*, 70: 142-48.
- Baron, T. A., E.; Leforban, Y.; Madec, F.; Guilimoto, H.; Plana Durán, J.; Vannier, P. 1992. Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann. Reach. Vét.* 23: 161-166.
- Bautista, E. M., and T. W. Molitor. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol* 10: 83-94.
- Bautista, E. M., J. J. M. Meulenberg, C. S. Choi, and T. W. Molitor. 1996a. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 141: 1357-1365.
- Bautista, E. M., P. Suarez, and T. W. Molitor. 1999. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol.* 144: 117-134.
- Bautista, E.M., J.J.M. Meulenberg, C.S. Choi, T.W. Molitor. 1996b. PRRS-specific T cell

- responses in infected and vaccinated pigs. In: *1<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia, p.63.
- Bell, A. 1998. Hot PRRS is still hot. *Pork (February)*, pp. 32-33.
- Benfield, D. A., E. Nelson, J. Christopher-Hennings, J. Collins, D. Chladek, W. Christianson, R. Morrison, D. Gorcyca. 1992b. Properties of SIRS isolate ATCC VR-2332 in United States and preliminary characterization of a monoclonal antibody to this virus. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4:19-21.
- Benfield, D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca, and D. Chladek. 1992a. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4: 127-133.
- Benfield, D., R. Rowland, J. Nelson, J. Neiger, E. Nelson, E., K.D. Rossow, J. Collins. 1996. A model for the study of persistent PRRSV infection. *Conf. Res. Workers Anim. I Dis. Abstr.* 187.
- Benfield, D.A., J. Christopher-Hennings, E.A. Nelson, R.R.R. Rowland, J.K. Nelson, C.C.L. Chase, K.d. Rossow. 1997. Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *Proc. 28<sup>th</sup> Ann.Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* Québec, Canadá. pp. 455-458.
- Benfield, D.A., J. Nelson, K. Rossow, R.R. Rowland, S.R. Lawson, M. Steffen, M. Collins. 1998. Pathogenesis and persistence of PRRS. In: *Proceedings Leman Conference*, pp. 169-186.
- Blackburn, P. W. 1991. The experience of veterinary practices in the United Kingdom. *Porcine reproductive and respiratory syndrome* : 46-47.
- Blaha, T. 1992. Epidemiological investigations into PEARS in Germany: consequences in fattening pigs. *Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc.*, 12:126.
- Bloemraad, M., E. P. d. Kluijver, A. Petersen, G. E. Burkhardt, G. Wensvoort, and E. P. De Kluijver. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet Microbiol.*, 42: 361-371.
- Bøtner, A., B. Strandbygaard, K. J. Sorensen, P. Have, K. G. Madsen, E. S. Madsen, and S. Alexandersen. 1997. Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec.* 141: 497-499.
- Bøtner, A., J. Nielsen, and V. Bille Hansen. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet. Microb.* 40: 3-4.
- Bøtner, A., J. Nielsen, M. B. Oleksiewicz, and T. Storgaard. 1999. Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection. *Vet Microbiol* 68: 187-95.
- Bouwkamp, F. T. 1999. The effect of vaccination of sows against PRRS in the Netherlands: the results of questionnaires. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 124: 530-535.
- Bukh, J., R.H. Miller, R.H. Purcell. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* 15, 41-63.
- Carman, S., S. Sandford, S. Dea. 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario-1978 to 1982. *Can. Vet. J.*, 36:776-777.
- Carvalho, L. F., J. Segales, and C. Pijoan. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs. *Vet Microbiol* 55: 241-6.
- Collins, J. E., D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw,

S. M. Goyal, S. McCullough, R. B. Morrison, H. S. Joo, D. Gorcyca, and D. Chladek. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate TCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4: 117-126.

Collins, J.E., D.A. Benfield, S.M. Goyal, D.P. Shaw. 1990. Experimental transmission of swine reproductive failure syndrome (mystery swine disease) in gnotobiotic pigs. *Conf. res. Workers in Anim. dis. Abstr.* 2.

Cooper, V. L., A. R. Doster, R. A. Hesse, and N. B. Harris. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J Vet Diagn Invest* 7: 313-20.

Cho, S. H., W. R. Freese, I. J. Yoon, A. V. Trigo, and H. S. Joo. 1993. Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. *J Vet Diagn Invest* 5: 259-60.

Choi, C. C., W.; Collins, J.; Joo, H.; Molitor, T. 1992. Antibody dependent enhancement of SIRS virus replication. *Am. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* 4: 30.

Christianson, W. T., C. S. Choi, J. E. Collins, T. W. Molitor, R. B. Morrison, and H. S. Joo. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 57: 262-8.

Christianson, W. T., J. C. Connor, C. K. Crowe, H. S. Joo, I. J. Yoon, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994. Elimination of PRRS virus with Isowean. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.

Christianson, W. T., J. E. Collins, D. A. Benfield, L. Harris, D. E. Gorcyca, D. W. Chladek, R. B. Morrison, and H. S. Joo. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res.* 53: 485-488.

Christopher Hennings, J., E. A. Nelson, and D. A. Benfield. 1996. Detecting PRRSV in boar semen. *Swine Health and Production* 4: 37-39.

Christopher Hennings, J., E. A. Nelson, J. K. Nelson, K. D. Rossow, J. L. Shivers, M. J. Yaeger, C. C. L. Chase, R. A. Garduno, J. E. Collins, and D. A. Benfield. 1998. Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars. *Vet. Pathol.* 35: 260-267.

Christopher-Hennings, J., E. A. Nelson, J. K. Nelson, and D. A. Benfield. 1997. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am J Vet Res* 58: 40-5.

Christopher-Hennings, J., E. A. Nelson, J. K. Nelson, R. J. Hines, S. L. Swenson, H. T. Hill, J. J. Zimmerman, J. B. Katz, M. J. Yaeger, C. C. Chase, and et al. 1995b. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 1730-4.

Christopher-Hennings, J., E. A. Nelson, R. J. Hines, J. K. Nelson, S. L. Swenson, J. J. Zimmerman, C. L. Chase, M. J. Yaeger, and D. A. Benfield. 1995a. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7: 456-64.

Chueh, L. L., K. H. Lee, F. I. Wang, V. F. Pang, and C. N. Weng. 1998. Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus Taiwan MD-001 strain. *Adv Exp Med Biol* 440: 795-9.

Chung, W. B., M. W. Lin, W. F. Chang, M. Hsu, and P. C. Yang. 1997. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in intensive farrow-to-finish pig herds. *Can J Vet Res* 61: 292-8.

de Jong, M.F., W. Cromwijk, P. Van't Veld. 1991. The new pig disease: Epidemiology and losses in the Netherland. In: *Report of the First EC Seminar/Workshop on "The New Pig*

*Disease, Porcine reproductive and Respiratory Syndrome". pp. 9-19.*

Dea S., R. Bilodeau, R. Sauvageau, G. Martineau. 1990. Virus isolations from farms in Québec experiencing severe outbreaks of respiratory and reproductive problems. In *Proc Mystery Swine dis. Comm. Meet Livest Conserv. Inst.*, Denver, Colo., pp. 67-72.

Dea, S., R. Bilodeau, R. Athanaseous, R. A. Sauvageau, and G. P. Martineau. 1992a. PRRS [porcine reproductive and respiratory syndrome] syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Veterinary Record* 130: 167.

Dea, S., R. Bilodeau, R. Athanassious, R. A. Sauvageau, and G. P. Martineau. 1992b. PRRS in Québec: virologic and pathologic aspects. *Am.Assoc.Swine Pract. Newsl.*, 4:2-7.

Dea, S., R. Bilodeau, R. Athanassious, R. Sauvageau, and G. P. Martineau. 1992c. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can. Vet. J.* 33: 801-808.

Dee, S. 1992. Investigation of a nationwide outbreak of SIRS using a telephone survey. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4:41-44.

Dee, S. A. 1996. The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important? *Swine Health and Production* 4: 147-149.

Dee, S. A. 1997. Elimination of PRRS virus: is it possible? *Large Animal Practice* 18: 36-38.

Dee, S. A., and H. Joo. 1997. Strategies to control PRRS: a summary of field and research experiences. *Vet Microbiol* 55: 347-53.

Dee, S. A., and H. S. Joo. 1994a. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec* 135: 6-9.

Dee, S. A., and H. S. Joo. 1994b. Recurrent reproductive failure associated with porcine reproductive and respiratory syndrome in a swine herd. *J Am Vet Med Assoc* 205: 1017-8.

Dee, S. A., H. Joo, and H. S. Joo. 1997c. Strategies to control PRRS: A summary of field and research experiences. *Vet. Microbiol.* 55: 1-4.

Dee, S. A., H. S. Joo, and D. D. Polson. 1996a. Improved performance of a large pig complex after sequential nursery depopulation. *Vet Rec* 138: 31-4.

Dee, S. A., H. S. Joo, and J. HanSoo. 1994a. Recurrent reproductive failure associated with porcine reproductive and respiratory syndrome in a swine herd. *J.A.V.M.A.* 205: 1017-1018.

Dee, S. A., H. S. Joo, B. K. Park, T. W. Molitor, and G. Bruna. 1998. Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. *Vet Rec* 142: 569-72.

Dee, S. A., H. S. Joo, D. D. Polson, and W. E. Marsh. 1997a. Evaluation of the effects of nursery depopulation of the profitability of 34 pig farms. *Vet Rec* 140: 498-500.

Dee, S. A., H. S. Joo, D. D. Polson, B. K. Park, C. Pijoan, T. W. Molitor, J. E. Collins, V. King. 1997b. Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. *Vet Rec* 140: 247-8.

Dee, S. A., H. S. Joo, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994b. Elimination of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus spread in endemically infected swine herds by nursery depopulation. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.

Dee, S. A., H. S. Joo, S. Henry, L. Tokach, B. K. Park, T. Molitor, and C. Pijoan. 1996b. Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. *Swine Health and Production* 4: 181-184.

Dee, S. A., T. W. Molitor, and K. D. Rossow. 2000. Epidemiological and diagnostic

observations following the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a breeding herd of pigs by the test and removal protocol. *Vet Rec* 146: 211-3.

Dee, S., R.B. Morrison, H.S. Joo. 1993. Eradicating porcine reproductive and respiratory syndrome (PPRS) virus using two-site production and nursery depopulation. *Swine Health Prod.*, 1:20-23.

Depner, K. R., E. Lange, S. Pontrakulpjpat, and D. Fichtner. 1999. Does porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiate classical swine fever virus infection in weaner pigs? *J Vet Med. Series B* 46: 485-491.

Dial, G., R. Hull, C. Olson, H. Hill. 1990. Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. In: *MSD Comm.Meet.* Denver, USA. pp. 3-6.

Dial, G., T. Parson. 1989. SMEDI-like syndrome (EMC?). In: *Proc.20<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, 20, 435.

Domingo, E., J. Holland. 1992. complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. In: Setlow, J.K. (Ed), *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Vol.14, Plenum, New York, pp.18-82.

Domingo, E., E. Baranowsky, C.M. Ruiz-Jarabo, A.M. Martin-Hernandez, J.C. Saiz, C. Escarmis. 1998. Quasispecies structure and persistance of RNA virus. *Emerging Infect. Dis.*, 4: 521-527.

Drew T. 2000. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Res.* 31: 37-39.

Duan, X. N., H. J.; Favoreel, H. W.; Pensaert, M. B. 1998. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 72: 4520-3.

Duan, X., H. J. Nauwynck, and M. B. Pensaert. 1997a. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PPRSV). *V Microbiol.* 56: 1-2.

Duan, X., H. J. Nauwynck, and M. B. Pensaert. 1997b. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PPRSV). *Arch Virol.* 142: 2483-2497.

Duarte, E.A., I.S. Novella, S.C. Weaverm E. Domingo, S. Wain-Hobson, D.K. Clarke, A. Moya, S.F. Elena, J.C. de la Torre, J.J. Holland. 1994. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect. Agents Dis.*, 3: 201-214.

Edwards, S., I.B. Robertson, J. Wilemith, J. Ryan, C. Kilner, D. Paton, T. Drew, I. Brown, J. Sand. 1992. PRRS (blue-eared pig diseases) in Great Britain. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 32-36.

European Commission, Directorate General for Agriculture. 1991. The new pig disease: Conclusions reached at the seminar. In *The New Pig Disease: Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome. A report on the Seminar/workshop Held in Brussels on 29-30 Apr 1991*, pp. 82-86.

Freese, W. R., H. S. Joo, and J. Han Soo. 1994. Cessation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PPRS) virus spread in a commercial swine herd. *Swine Health and Production* 2: 13-15.

Gagnon, C.A.W.; B. Massie, C.A. Dea. 1999. Generation of inducible recombinant adenoviruses expressing the N and GP5 proteins of PRRS virus. In: *Proceeding of PRRS Symposium*, Ploufragan. France.

Gagnon, C. A., and S. Dea. 1998. Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. *Can J Vet Res* 62: 110-6.

Gajecki, M., K. Pirus, M. Baranowski, K. Obremsky. 1996. Changes in hematology and blood serum biochemistry of piglets infected with Lelystad virus. In: *Proc. of the 14<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia, p.56.

Galina, L., C. Pijoan, M. Sitjar, W. T. Christianson, K. Rossow, and J. E. Collins. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* 134: 60-4.

Gimenez H.B.K.; H.M., P. Cash. 1989. *In vitro* enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cells by human sera. *J.Gen. Virol.* 70: 89-96.

Goldberg, T. L., E. C. Hahn, R. M. Weigel, and G. Scherba. 2000. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J Gen Virol* 81 Pt 1: 171-9.

Gonin, P. P., B.; Gagnon, C. A.; Dea, S. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* 11: 20-6.

Gorcyca, D., K. Schlesinger, D. Chladek, R. Morrison, G. Wensvoort, S. Dee, D. Polson. 1997b. A summary of experimental and field studies evaluating the safety and efficacy of RespPRRS/Repro<sup>TM</sup> for the control of PRRS-induced reproductive disease. In: *Porc. 26<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp 1-22.

Gorcyca, D., K. Schlesinger, D. Chladek, W. Behan, D. Polson, M. Roof, D. Doitchenoff. 1995a. RespPRRS: a new tool for the prevention and control of PRRS in pigs. In: *Proc. 26<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp. 1-22.

Gorcyca, D.E., G. Spronk, R. Morrison, D. Polson. 1995b. Field evaluation of a new MLV PRRS virus vaccine: applications for PRRS prevention and control in swine herds. In: *Proc. 26<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp. 401-412.

Gorcyca, D.E., K.J. Schlesinger, D.C. Chladek, M.B. Roof, D.D. Polson, M. Daniel, R. Primo. 1997a. Efficacy study of PRRS modified live virus (MLV) vaccine when administered to pregnant sows or gilts in the second trimester of gestation and experimentally challenged in the third trimester. In: *Proc. 28<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá, pp. 175-176.

Gorcyca, D.E., K.J. Schlesinger, P.W. Geeding, D.W. Chladek, J.A. Short. 1996a. The effect of maternal immunity on respiratory disease syndrome caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia, p.61.

Gorcyca, D.E., K.J. Schlesinger, P.W. Geeding, D.W. Chladek, J.A. Short. 1996b. Protection against the reproductive disease caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by vaccinating with a modified live virus PRRS vaccine prior to breeding. In: *Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia, p.66.

Gordon, S.C. 1992. Effects of blue-eared pig disease on a breeding and fattening unit. *Vet.Rec.*, 130: 513-514.

Goyal, S. M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 5: 656-64.

Groschup, M. H., A. Brun, and B. Haas. 1993. Serological studies on the potential synergism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and influenza-, corona- and paramyxoviruses in the induction of respiratory symptoms in swine. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 40: 681-9.

Grosse Beilage, E., and G. E. Beilage. 1992. Epidemiological investigations into PEARs in Germany: influence on reproduction. *Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc.* 12: 125.

Halbur, P. G. P., P. S.; Frey, M. L.; Landgraf, J.; Eernisse, K.; Meng, X. J.; Lum, M. A.; Andrews, J. J.; Rathje, J. A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*

32: 648-660.

Halbur, P., P. X. Meng, W. Hagemoser, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994. Marked variability in pathogenicity of nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in 5-week-old CDCD pigs. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.

Halbur, P.G., P.S. Paul, M.L. Frey, J. Lindgraf, K. Eernisse, X.J. Meng, J.J. Andrews, M.a. Lum, Rathje, J.A. 1996a. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, 33: 159-170.

Halbur, P.G., P.S. Paul, X-J. Meng, M.A. Lum, J.J. Sndrews, J.A. Rathje. 1996b. Comparative pathogenicity of nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum -deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8:11-20.

Hesse, R.A., L.P. Couture, M.L. Lau, K.K. Wunder, T.L. Wasmoen. 1996b. Efficacy of Prime Pc PRRS in controlling PRRS reproductive disease: Heterologous challenge. In: *Proc. 27<sup>th</sup> Ann. Meet Am Assoc Swine Pract.*, pp. 107-110.

Hesse, R.A., L.P. Couture, M.L. Lau, S.K. Dimmick, S.R. Ellsworth. 1996a. Efficacy of Prime Pc PRRS in controlling PRRS reproductive disease: Homologous challenge. In: *Proc. 27<sup>th</sup> Ann. Meet Am Assoc Swine Pract.*, pp. 103-106.

Hesse, R.A., L.P. Couture, M.L. Lau, T.L. Wasmoen, A.R. Doster, V.L. Cooper. 1997. Efficacy of Prime Pac PRRS in controlling PRRS respiratory disease: homologous and heterologous challenge. In: *Proc. 28<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp.137-144.

Hill, H., W. Owen, K. Eernisse, J. Zimmerman, E. Uhlenhopp, M. Frey. 1992. Prevalence of SIRS virus in Iowa swine herds. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4:47.

Hirose, O., I. Shibata, H. Kudou, Y. Samegai, S. Yoshizawa, M. Ono, M. Nishimura, T. Hiroike, K. Kageyama, and T. Sakano. 1995. Experimental infection of SPF piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses isolated from two farms. *J Vet Med Sci* 57: 991-5.

Hopper, C.C., M.E.C. White, N. Twiddy. 1992. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet.Rec.*, 131: 140-14.

Hutchinson, D., R. Hesse, T. Wasmoen. 1997. Evaluation of semen quality and virus shedding in boars vaccinated with PrimePacPRRS and challenged with virulent PRRS virus. In: *Proc. 28<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp.145-148.

Joo, H. S. Y., I.J. Yoon 1994. Virologic, serologic and pathogenic differences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. *Proc. 13th IPVS congress.*, Bangkok, Thailandia. p.57.

Kang, Y., J. Shin, Y. Kim, Y. B. Kang, J. H. Shin, Y. J. Kim, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994. PRRS: seroepidemiology of indirect fluorescent antibodies in selected pig breeding farms in Korea. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.

Kang, Y.B., Y.J. Kim, D.H. Cho, G.H. Jang, P. Seok, J.H. Shin. 1996. Efficacy and safety trials of attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccine (Ingelvac). In: *Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p.65.

Kapur, V., M. Elam, T. Pawlovich, M. Murtaugh. 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. *J.Gen. Virol.*, 77:1271-1276.

Kawashima, N., K. Maruyama, H. S. Joo, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994. Herd

investigation and control management of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) outbreak in a Japanese farm. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.

Kay, R. M., S. H. Done, and D. J. Paton. 1994. Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. *Vet Rec* 135: 199-204.

Keffaber, K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 1:1-10.

Kim, H. S., J. Kwang, I. J. Yoon, H. S. Joo, and M. L. Frey. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133: 477-83.

Kono, Y., T. Kanno, M. Shimizu, S. Yamada, S. Ohashi, M. Nakamine, and J. Shirai. 1996. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *J Vet Med Sci* 58: 941-6.

Kreutz, L. C., and M. R. Ackermann. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Research* 42: 1-2.

Kritas, S.K., C. Alexopoulos, K. Saoulidis, S.C. Kyriakis. 1999. Clinical protection conferred to fattening pigs by a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome (Porcine PRRS, Intervet) under field conditions. In: *Proc. of 3<sup>rd</sup> International symp. on PRRS and Aujeszky's Diseases*, Ploufragan, Francia. p. 267.

Kurame, I.; B.J. Mady, F.A. Ennis. 1991. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Rev. Med. Virol.*, 1:211-221.

Kuwahara, H., T. Nunoya, M. Tajima, A. Kato, and T. Samejima. 1994. An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan. *J Vet Med Sci* 56: 901-9.

Lager K.M., Mengeling, W.L., 1997. Current status of vaccines and vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Porc. 28<sup>th</sup> Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 443-446.

Lager, K. M., and W. L. Mengeling. 1995. Pathogenesis of in utero infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 59: 187-92.

Lager, K. M., W. L. Mengeling, and S. L. Brockmeier. 1996b. Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet Rec* 138: 227-8.

Lager, K. M., W. L. Mengeling, and S. L. Brockmeier. 1997a. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 58: 127-33.

Lager, K. M., W. L. Mengeling, and S. L. Brockmeier. 1997b. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 58: 113-25.

Lager, K. M., W. L. Mengeling, and S. L. Brockmeier. 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am J Vet Res* 60: 1022-7.

Lager, K.M., W.L. Mengeling, R.D. Wesley, P.G. Halbur, S.D. Sorden. 1998. Acute PRRS. In: *29<sup>th</sup> Annual Meet. Amer. Assoc. of Swine Pract.*, Des Moines, IA, pp. 449-453.

Lager, K.M., W.L. Mengeling, S.L. Brockmeier. 1996a. Pathogenesis of fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection during early and late gestation. In: *Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p.55.

Lager, K.M., W.L. Mengeling. 1995. Pathogenesis of *in utero* infection in porcine fetuses



with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can.J.Vet.Res.*, 59: 187-192.

Larochelle, R., and R. Magar. 1995. Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin-fixed tissues. *J Vet Diagn Invest* 7: 540-3.

Larochelle, R., and R. Magar. 1997. Differentiation of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus genotypes by in situ hybridization. *J Virol Methods* 68: 161-8.

Larochelle, R., H. Mardassi, S. Dea, and R. Magar. 1996. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J Vet Diagn Invest* 8: 3-10.

Lawson, S. R., K. D. Rossow, J. E. Collins, D. A. Benfield, and R. R. Rowland. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res* 51: 105-13.

Levine, B., Q. Huang, J.T. Isaacs, J.C. Reed, D.E. Griffin, J.M. Hardwick. 1993. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bel-2-celular oncogene. *Nature*, 361: 739-742.

Leyk, W. 1991. Observation in three affected herds in North Rhine Westphalia. In Report of the first EC Seminar/Workshop on "The New Pig Disease, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome". pp.3-4.

Li, K., Z. Chen, P.G.M. Plagemann. 1999. High-frequency homologous genetic recombination of an arterivirus, lactate dehydrogenase-elevating virus, in mice and evolution of neuropathogenic variants. *Virology*, 258: 73-83.

Lindhaus, W., and B. Lindhaus. 1991. Mystery swine disease. *Praktische Tierarzt* 72: 423-425

Loemba, H. D. M., S.; Mardassi, H.; Archambault, D.; Dea, S. 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141: 751-761.

Lopez Fuertes, L., N. Domenech, B. Alvarez, A. Ezquerro, J. Dominguez, J. M. Castro, and F. Alonso. 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* 64: 33-42.

Loula, T. 1991. Mystery pig disease. *Agri Practice* 12: 23-34.

Loula, T.J. 1995. Weaning early for higher health. *Pig Internl.*, 6: 31-32.

Loula, T.J. 1996. My views on PRRS vaccine use. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp.150-152.

Llanos, A.U., O.R. Gutiérrez, J.E. Fernández, E.F. Díaz. 2000. Utilización de la cepa atenuada ALL-183 del virus PRRS en la prevención de trastornos reproductivos en el ganado porcino. *Anaporc*, 196: 50-65.

Madsen, K. G., C. M. Hansen, E. S. Madsen, B. Strandbygaard, A. Botner, and K. J. Sorensen. 1998. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol* 143: 1683-700.

Magar, R.; R. Larochelle, Y. Robinson, C. Dubuc. 1993. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can.J.Vet.Res.*, 57: 300-304.

Mardassi, H., L. Wilson, S. Mounir, and S. Dea. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2197-2203.

Mardassi, H., S. Mounir, and S. Dea. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Archives of Virology* 140: 1405-1418.

Mavromatis, I., S.K. Kritas, C. Alexopoulos, A. Tsinas, C. Kyriakis. 1999. Field evaluation of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in fattening pigs. *J. Vet. Med. B*, 46: 603-12.

Meier, W., J. Wheeler, R.J. Husmann, F.A. Osorio, F.A. Zuckermann. 2000. Characteristics of the immune response of pigs to wild-type PRRS virus or to commercially available vaccines: an unconventional response. In: *Procc. Am. Assoc. of Swine Pract.*, pp. 415-18.

Meng, X. J. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 74: 309-29.

Meng, X. J. P., P. S.; Halbur, P. G.; Lum, M. A. 1996. Characterization of a high-virulence US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 374-381.

Meng, X. J., P. S. Paul, P. G. Halbur, and I. Morozov. 1995a. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 76: 3181-8.

Meng, X. J., P. S. Paul, P. G. Halbur, and M. A. Lum. 1995b. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol* 140: 745-55.

Meng, X.J., P.S. Paul, P.G. Halbur. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J.Gen.Virol.*, 75: 1795-1801.

Mengeling, W. L. L., K. M.; Vorwald, A. C. 1996a. An overview on vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Proc. AD Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA, pp. 139-42.

Mengeling, W. L. L., K. M.; Vorwald, A. C. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *Am. J. Vet. Res.* 59: 1540-1544.

Mengeling, W. L., A. C. Vorwald, K. M. Lager, and S. L. Brockmeier. 1996b. Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am J Vet Res* 57: 834-9.

Mengeling, W. L., A. C. Vorwald, K. M. Lager, S.L. Brockmeier. 1996c. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. *Vet.Microbiol.*, 49: 105-115.

Mengeling, W. L., A. C. Vorwald, K. M. Lager, D. F. Clouser, and R. D. Wesley. 1999b. Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 60: 334-40.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, and A. C. Vorwald. 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 55: 1391-8.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, and A. C. Vorwald. 1995. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7: 3-16.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, and A. C. Vorwald. 1998. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval. *Am J Vet Res* 59: 52-5.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, and A. C. Vorwald. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *American Journal of Veterinary Research* 59: 1540-1544.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, and A. C. Vorwald. 1999a. Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res* 60: 796-801.

Mengeling, W. L., K. M. Lager, R. D. Wesley, D. F. Clouser, A. C. Vorwald, and M. B. Roof. 1999c. Diagnostic implications of concurrent inoculation with attenuated and virulent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 60: 119-22.

Mengeling, W. L., P. S. Paul, and K. M. Lager. 1993. Virus-induced maternal reproductive failure of swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 203: 1268-1272.

Mengeling, W.L., K.M. Lager. 2000. A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet.Res*, 31: 61-69.

Meulenberg, J. J. M., A. P. v. Nieuwstadt, A. v. Essen Zandbergen, J. P. M. Langeveld, A. P. Van Nieuwstadt, and A. Van Essen Zandbergen. 1997. Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *Journal of Virology* 71: 6061-6067.

Meulenberg, J. J. M., M. M. Hulst, E. J. d. Meijer, P. Moonen, A. d. Besten, E. P. d. Kluyver, G. Wensvoort, R. J. M. Moormann, E. J. De Meijer, A. Den Besten, and E. P. De Kluyver. 1993. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology New York* 192: 62-72.

Meulenberg, J. J. M., P. den. Besten., A.; de Kluyver, E.; C; Moormann, R. J.M.; Schaaper, W.M.M.; Wensvoort, G. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206: 155-163.

Meulenberg, J.J.M. 2000. PRRSV, the virus. *Vet.Res.*, 31:11-21.

Molitor, T., G. Leitner, C. Choi, J. Risdahl, D. Rossow, J. Collins. 1992. Modulation of host immune responses by SIRS virus. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 27-28.

Molitor, T., J. Shin. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 101-102.

Molitor, T.W. 1993. Immune response to PRRS virus. In: *AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 49-50.

Molitor, T.W., E.M. Bautista, C.S. Choi. 1997. Immunity to PRRSV: double-edged sword. *Vet.Microbiol.*, 55(1-4): 265-276.

Moore, C. 1990. Clinical presentation of mystery swine disease in the growing pig. In: *Porc Mystery Swine disl Comm. Meet. Livest. conserv. Inst. Denver*, Colo. pp.41-49.

Morozov, I., X. J. Meng, and P. S. Paul. 1995. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology* 140: 1313-1319.

Morrison, R. B., J. E. Collins, L. Harris, W. T. Christianson, D. A. Benfield, D. W. Chladek, D. E. Gorceyca, and H. S. Joo. 1992. Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). *J Vet Diagn Invest.* 4: 186-188.

Murtaugh, M. P., M. R. Elam, and L. T. Kakach. 1995a. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol* 140: 1451-60.

Nelsen, C. J., M. P. Murtaugh, and K. S. Faaberg. 1999. Porcine reproductive and

respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J. Virol.* 73: 270-280.

Nelson, E. A. C.-H., J.; Benfield, D. A. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 6: 410-5.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, L.L. Harris, J.E. Collins, D.W. Chladek, D.E. Gorcyca, D.A. Benfield. 1992. Preliminary characterization of monoclonal antibodies to a United States isolate (ATCC VR) of porcine epidemic abortion and respiratory virus. In: *Proc 12<sup>th</sup> IPVS Congress*, La Haya, Holanda. pp.121-122.

Nielsen, J.; A. Bøtner. 1997. Hematological and immunological parameters of 4 <sup>1/2</sup>-month old pigs infected with PRRS virus. *Vet.Microbiol.*, 55: 289-94.

Nielsen, T. L., J. Nielsen, P. Have, P. Baekbo, R. Hoff-Jorgensen, and A. Botner. 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 54: 101-112.

Ohlinger, V. F., F. Weiland, B. Haas, N. Visser, R. Ahl, T. C. Mettenleiter, E. Weiland, H. J. Rziha, A. Saalmuller, and O. C. Straub. 1991. Aetiological studies of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Tierarztliche Umschau* 46: 703-704.

Ohlinger, V., B. Haas, A. Sallmüller, J. Beyer, J. Teuffert, N. Visser, F. Weiland. 1992. *In vivo* and *in vitro* studies on the immunobiology of PRRS. *Am. Assoc. Swine Pract. Newl.*, 4:24.

Ohlinger, V.F. 1992. PRRS antibodies were present in E. Germany in 1988/9. *PDIC N ewsl.*, 1 december.

Oleksiewicz, M. B., A. Botner, P. Toft, T. Grubbe, J. Nielsen, S. Kamstrup, and T. Storgaard. 2000. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein. *Virology* 267: 135-40.

Olsen, C.W.; W.V. Corapi, C.K. Ngichabe, J.D. Baines, F.W. Scott. 1992. Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages. *J. Virolog.*, 66: 956-65.

Osorio, F.A., F. zuckermann, R. Wills, W. Meier, S. Christian, J. Galeota, A. Doster. 1998. PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strain of high virulence. In: *Allen D. Leman Conference*. Vol. 25, pp. 176-182.

Park, B.K., S.J. Kim, Y.T. Chi, C.S. Park. 1996b. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome by *in situ* hybridization with non-radioactive probes. In: *Proc. 1<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p.81.

Paton, D. J., I. Brown, S. Done, A. C. Scott, and S. Edwards. 1991. Laboratory investigations of "blue eared pig disease" in Great Britain. *Porcine reproductive and respiratory syndrome* : 36.

Paton, D. J., T. Drew, I. H. Brown, S. Edwards, and S. H. Done. 1992. Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Pig Veterinary Journal* 29: 188-192.

Pejsak, Z., P. Stadejek, P. Kolodziejczyk. 2000. Effects of vaccination against PRRS on reduction of respiratory infections in grower-finisher pigs. In: *Proceedings: The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia*.

Pesch, S., U. Schmidt, V.F. Ohlinger. 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with Porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and Porcine Circovirus type 2 (PCV2). In: *Proceedings: The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia*.

Pijoan, C., G. Solano, J. Segalés. 1994. PRRS virus and secondary disease. In:

*Proc.AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 225-226.

Pirzadeh, B., and S. Dea. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78: 1867-73.

Pirzadeh, B., and S. Dea. 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 79: 989-999.

Pirzadeh, B., C. A. Gagnon, and S. Dea. 1998. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *C J Vet Res* 62: 170-177.

Plagemann, P. G. W., V. Moennig. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 41: 99-192.

Plana Duran, J., I. Climent, J. Sarraseca, A. Urniza, E. Cortes, C. Vela, and J. I. Casal. 1997a. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 14: 19-29.

Plana, J., M. Vayreda, J. Vilarrasa, M. Bastons, R. Rosell, M. Martinez, A. S. Gabriel, J. Pujols, J. L. Badiola, J. A. Ramos, and M. Domingo. 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet Microbiol.* 33: 1-4.

Plana-Duran, J.; M. Bastons, A. Urniza, M. Vayreda, X. Vila, and H. Mane. 1997b. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 55: 361-70.

Plana-Duran, J.; M. Moutiño, E. Viaplana, M. Balasch, I. Casal, M.J. Rodríguez, L. Enjuanes, A. Izeta, S. Alonso, I. Solá. 2000. New strategies in the development of PRRS vaccines. Subunit vaccines and self-limiting vectors, based on defective coronaviruses. *Vet.Res.*, 31: 41.

Pol J.M.A., J.E. van Dijk, G. Wensvoort, C. Terpstra. 1991. Pathological, ultrastructural and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome PEARS). *Vet. Q*, 13: 137-143.

Pol, J. M. A., F. Wagenaar, and J. E. G. Reus. 1997. Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet Microbiol.* 55: 1-4.

Pol, J. M., F. Wagenaar. 1992. Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *AASP Newsletter* 4: 29.

Polson, D. D. M., W.E.; Dial, G.D.; Christianson, W.T. 1992. Financial impact of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). Pages 132. *Proc. 12th Congr. Int. Pig. Vet. Soc.*

Prieto, C., P. Suarez, I. Simarro, C. Garcia, A. Fernandez, and J. M. Castro. 1997a. Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet Microbiol* 57: 301-11.

Prieto, C., P. Suarez, I. Simarro, C. Garcia, S. Martin Rillo, and J. M. Castro. 1997b. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 47: 647-654.

Prieto, C., P. Suarez, J. M. Bautista, R. Sanchez, S. M. Rillo, I. Simarro, A. Solana, and J. M. Castro. 1996a. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45: 383-395.

Prieto, C., P. Suarez, S. Martin Rillo, I. Simarro, A. Solana, and J. M. Castro. 1996b.

Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilized ova in vitro. *Theriogenology* 46: 687-693.

Prieto, C., R. Sanchez, S. Martin-Rillo, P. Suarez, I. Simarro, A. Solana, and J. M. Castro. 1996c. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 138: 536-9.

Raymakers, R. 1991. The experience of the veterinary practice in Someren (Netherlands) with PEARs. *Porcine reproductive and respiratory syndrome* : 48.

Reed, J.J., R.H. Muench. 1938. A simple method to estimating fifty percent end points. *am. J. Hyg.*, 27: 493-97.

Reynaud, G., A. Brun, C. Charreyre. 2000. Zootechnical efficacy of vaccination of gilts and sows with an inactivated PRRS vaccine in a contaminated environmet. In: *Proceedings: The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congres, Melbourne, Australia*.

Robertson, I. B., and M. V. Thrusfield. 1992. Porcine reproductive and respiratory syndrome (blue eared pig disease): some aspects of its epidemiology. *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine: Tenth anniversary Proceedings 1st 3rd April* .

Roof, M.B., D. Gingerich-Feil, D. Gorcyca, K. Schlesinger, D. chladek. 1995. Serological evaluation of pigs vaccinated with RespPRRS<sup>®</sup> using the IDEXX PRRS ELISA. In: *2<sup>nd</sup> Internl. sump. on PRRS, Copenhagen, Dinamarca*. p.50.

Rossow, K. D. S., J. L.; Yeske, P. E.; Polson, D. D.; Rowland, R. R.; Lawson, S. R.; Murtaugh, M. P.; Nelson, E. A.; Collins, J. E. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet Rec* 144: 444-8.

Rossow, K. D., D. A. Benfield, S. M. Goyal, E. A. Nelson, J. Christopher Hennings, and J. E. Collins. 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 33: 551-556.

Rossow, K. D., E. M. Bautista, S. M. Goyal, T. W. Molitor, M. P. Murtaugh, R. B. Morrison, D. A. Benfield, and J. E. Collins. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diagn Invest* 6: 3-12.

Rossow, K. D., J. E. Collins, S. M. Goyal, E. A. Nelson, J. Christopher-Hennings, and D. A. Benfield. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 32: 361-73.

Rowland, R. R., M. Steffen, T. Ackerman, and D. A. Benfield. 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 259: 262-6.

Samsom, J. N., T. G. de Bruin, J. J. Voermans, J. J. Meulenber, J. M. Pol, and A. T. Bianchi. 2000. Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. *J Gen Viro* 81 Pt 2: 497-505.

Sandford, S. 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARs): Establishment and spread between 1987 and 1992 in Ontario, Canada. In: *Proc. 12<sup>th</sup> IPVS Congress, Bolonia, Italia*, p. 77.

Sandford, S.E., B. Nuhn. 1996. Reduced morbidity and mortality and improved days-to-market in piglets vaccinated with Ingelvac RespPRRS<sup>®</sup> in a PRRS endemic herd. In: *Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress, Bolonia, Italia*. p.77.

SAS Software<sup>®</sup>.

Shibata, I., K. Uruno, and M. Mori. 1996. Serological property and replication in cell cultures of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 58: 805-7.

- Shibata, I., M. Mori, K. Uruno, Y. Samegai, and M. Okada. 1997. In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophages and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection. *J Vet Med Sci* 59: 539-43.
- Shimizu, M., S. Yamada, K. Kawashima, S. Ohashi, S. Shimizu, and T. Ogawa. 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Immunol Immunopathol* 50: 19-27.
- Shimizu, M., S. Yamada, Y. Murakami, T. Morozumi, H. Kobayashi, K. Mitani, N. Ito, M. Kubo, K. Kimura, M. Kobayashi, and et al. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J Vet Med Sci* 56: 389-91.
- Shin, J. H., Y. B. Kang, Y. J. Kim, S. H. Yeom, C. H. Kweon, W. Y. Lee, Y. H. Jean, E. K. Hwang, J. C. Rhee, S. H. An, I. S. Cho, J. S. Oh, H. S. Joo, C. S. Choi, and T. W. Molitor. 1993. Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. I. Detection of indirect fluorescent antibodies. *RDA Journal of Agricultural Science, Veterinary* 35: 572-576.
- Shin, J., J. Torrison, C. S. Choi, S. M. Gonzalez, B. G. Crabo, and T. W. Molitor. 1997. Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Vet Microbiol.* 55: 337-46.
- Shin, J., J. Torrison, Y. B. Kang, and T. W. Molitor. 1996. *In situ* localizatin of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar tissues. In: *Proc.14<sup>th</sup> IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p.57.
- Sirinarmitr, T., Y. Zhang, J. P. Kluge, P. G. Halbur, and P. S. Paul. 1998. A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 79: 2989-95.
- Snijder E.J., J.J.M. Meulenbergh. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J.Gen.Virol.*, 79: 961-979.
- Solano, G. I., J. Segales, J. E. Collins, T. W. Molitor, and C. Pijoan. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with Haemophilus parasuis. *Vet Microbiol* 55: 247-57.
- Srinivasappa, J., J. Clark, B. Acree, H.J. Chu. 1999. Safety of Fort Dodge Laboratories Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine in pigs. In: *Am. Assoc. of Swine Pract.*, pp.141-45.
- Stevenson, G. W., W. G. Van Alstine, and C. L. Kanitz. 1994. Characterization of infection with endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *J Am Vet Med Assoc* 204: 1938-42.
- Stevenson, G. W., W. G. Van Alstine, C. L. Kanitz, and K. K. Keffaber. 1993. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J Vet Diagn Invest* 5: 432-4.
- Stevenson, G.W., W.G. Van alstine, C.L. Kanitz, K.K. Keffaber. 1992. Isolation of SIRS virus from nursery pigs in two herds without current reproductive failure. In: *Proc. Annu.Meet. Livest. conserv. Inst.*, pp. 253-259.
- Stockhofe Zurwieden, N., J. A. Navarro Camarro, E. Grosse Beilage, J. Chavez, and J. Pohlenz. 1993. Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) [porcine reproductive and respiratory syndrome-PRRS]. *J Vet Med. Series B* 40: 261-271.
- Straw, B., Dewl, Wilson. 1999 . In: *Disease of Swine*. Ed. B. Straw, S. D'Allaire, W. Mengeling, D. Taylor (Ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.75.
- Suarez, P. 2000. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet Res* 31: 47-55.
- Suárez, P., M DÍa-Guerra, C. Prieto, J. Dopazo, A. Solana, J.M. Castro. 1996a. Open

reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, 70:2876-2882.

Suarez, P., R. Zardoya, C. Prieto, A. Solana, E. Tabares, J. M. Bautista, and J. M. Castro. 1994. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch Virol* 135: 89-99.

Suarez, P., R. Zardoya, M. J. Martin, C. Prieto, J. Dopazo, A. Solana, and J. M. Castro. 1996b. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res* 42: 159-65.

Suarez, P., R. Zardoya, M. Jesus Martin, C. Prieto, J. Dopazo, A. Solana, J. M. Castro, and M. J. Martin. 1996c. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res.* 42: 1-2.

Sur, J. H. D., A. R.; Christian, J. S.; Galeota, J. A.; Wills, R. W.; Zimmerman, J. J.; Osorio, F. A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71: 9170-9.

Sur, J. H., A. R. Doster, and F. A. Osorio. 1998. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 35: 506-14.

Sur, J. H., V. L. Cooper, J. A. Galeota, R. A. Hesse, A. R. Doster, and F. A. Osorio. 1996. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *J Clin Microbiol* 34: 2280-6.

Sur, J.H.; A.R. Doster, J. Galeota, R.W. Wills, F.A. Osorio. 2000. PRRSV: Study of *in vivo* cell tropism and virus-induced apoptosis by *in situ* detection techniques. *Vet.Res.*, 31: 58.

Swenson, S. L., H. T. Hill, J. J. Zimmerman, L. E. Evans, D. Bechtol, S. Hopkins, R. Wills, K.J. Yoon, K.J. Schwart, H. Hill, M.J. McGinley. 1995. Exposure of gilts to PRRS virus by artificial insemination. In: *2<sup>nd</sup> Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca, p.42.

Swenson, S. L., H. T. Hill, J. J. Zimmerman, L. E. Evans, J. G. Landgraf, R. W. Wills, T. P. Sanderson, M. J. McGinley, A. K. Brevik, D. K. Ciszewski, and M. L. Frey. 1994a. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J.A.V.M.A.* 204: 1943-1948.

Swenson, S. L., H. T. Hill, J. J. Zimmerman, L. E. Evans, R. W. Wills, K. J. Yoon, K. J. Schwartz, G. C. Althouse, M. J. McGinley, and A. K. Brevik. 1994b. Artificial insemination of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-contaminated semen. *Swine Health and Production* 2: 19-23.

Terpstra, C., G. Wensvoort, E. A. t. Laak, and E. A. Ter Laak. 1991. The 'new' pig disease : laboratory investigations. *The new pig disease. Porcine respiration and reproductive syndrome. A report on the seminar workshop held in Brussels on .*

Terpstra, C., G. Wensvoort, L.A.M.G. Leengoed. 1992. Persistence of Lelystad virus in herds affected by porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. In: *Proc. 12<sup>th</sup> IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p.118.

Teuffert, J., H. Schluter, and T. Muller. 1998. Boar semen as a possible risk factor in infection occurrence of porcine reproductive and respiratory syndrome. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* 105: 340-45.

Thacker, C. 1992. Serological surveys in a herd before, during and after an outbreak of SIRS. *Am.J. Vet. Res.*, 48: 763-767.

Thacker, E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech, and B. J. Thacker. 1999. Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37: 620-7.



- Tolskaya, E.A., I.R. Lyudmila, M.S. Kolesnikova, T.A. Ivannikova, E.A. Smirnova, N.T. Raikhilin, V.I. Agol. 1995. Apoptosis-inducing and apoptosis preventing functions of poliovirus. *J. Virol.* 69:1181-1189.
- Torrison, J., M. Knoll, B. Weisman. 1996. Evidence of pig-to-pig transmission of a modified-live PRRS virus vaccine. In: *Proc. 27<sup>th</sup> Annu.Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp. 89-91.
- Umthum, A.R., W.L. Mengeling. 1999. Restriction fragment length polymorphism analysis of strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by use of a nested-set reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am.J.Vet.Res.*, 60: 802-06
- Valíček, L., I. Psikal, B. Smíd, L. Rodak, R. Kubalíková. 1996. Detection and epidemiology of PRRS in the Czech Republic. In: *Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress, Bolonia, Italia.* p.87.
- van Alstine, W.G., C.L. Kanitz, G.W. Stevenson. 1993. Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. *J.Vet. Diag. Invest.* , 5:621-622.
- van Woelsen P., G. Labarque, H. Nauwynck, G. Paul, A. Bonde Larsen, A. Eggen, N. Visser. 2000. Differentiation of european and north-american serotypes of PRRSV: prevalence and vaccine efficacy. In: *Proceedings: The 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congres, Melbourne, Australia.*
- van Woelsen, P., J. van der Wouw, N. Visser. 1994. Detection of porcine reproductive respiratory syndrome virus by polymerase chain reaction. *J.Virol. Method.*, 47: 273-278.
- van Woensel, P. A. M. v., K. Liefkens, S. Demaret, and P. A. M. Van Woensel. 1998. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet Rec.* 142: 510-512.
- Vezina, S. A., H. Loemba, M. Fournier, S. Dea, and D. Archambault. 1996. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 60: 94-9.
- Vogel, K., M. Kramer, J. Leuffert, and S. Kramer. 1991. PRRS - epidemiological and economic analyses in Germany. *Porcine reproductive and respiratory syndrome* : 49-52.
- Voicu, I. L. E., Y.M.A.s.; Cornaglia, E. 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus isolation in Québec. *73<sup>th</sup> Conf. Res. Work. Ani. Dis.* : 65.
- Voicu, I. L., A. Silim, M. Morin, and M. Elazhary. 1994. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet. Rec.* 134: 422-423.
- Wagstrom, E. A., K. J. Yoon, C. Cook, and J. J. Zimmerman. 2000. Diagnostic performance of a reverse transcription-polymerase chain reaction test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 12: 75-8.
- Wagstrom, E. A., K. Yoon, C. Cook, J. J. Zimmerman, and K. J. Yoon. Diagnostic performance of a reverse transcription-polymerase chain reaction test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest.* 12: 75-78.
- Weiland, E., M. Wiczorek Krohmer, D. Kohl, K. K. Conzelmann, and F. Weiland. 1999. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol.*, 66: 171-186.
- Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. A. Pol, E. A. t. Laak, M. Bloemraad, E. P. d. Kluyver, C. Kragten, L. v. Buiten, A. d. Besten, F. Wagenaar, J. M. Broekhuijsen, P. Moonen, T. Zetstra, E. A. d. Boer, H. J. Tibben, M. F. d. Jong, P. v. t. Veld, G. J. R. Groenland, J. A. v. Gennepe, M. T. Voets, J. H. M. Verheijden, J. Braamskamp, E. A. Ter Laak, E. P. De Kluyver, L. Van Buiten, A. Den Besten, E. A. De Boer, M. F. De Jong, P. Van ' t Veld, and J. A. Van Gennepe. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly* 13: 121-130.

Wensvoort, G., J. J. M. Meulenbergh, M. Murtaugh, D. Benfield, E. A. Nelson, K. Conzelmann, H. J. Thiel, E. Albina, and T. W. Drew. 1993. The porcine reproductive and respiratory syndrome. Characteristics and diagnosis of the causative virus. *Veterinary Biotechnology Newsletter* 3: 113-120.

Wesley, R. D., W. L. Mengeling, K. M. Lager, D. F. Clouser, J. G. Landgraf, and M. L. Frey. 1998. Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J Vet Diagn Invest* 10: 140-4.

White, M. E. C. 1992a. The clinical signs and symptoms of "blue-eared pig disease" (PRRS). *Pig Veterinary Journal* 28: 62-68.

White, M. E. C. 1992b. P.R.R.S.- clinical update. *Pig Veterinary Journal* 29: 179-187.

Wieczorek-Krohmer, M., F. Weiland, K. Conzelmann, D. Kohl, N. Visser, P. van Woensel, H. Thie, E. Weiland. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U.S. isolates. *Vet. Microbiol.*, 51: 257-266.

Wills, R. W., J. J. Zimmerman, K. J. Yoon, S. L. Swenson, M. J. McGinley, H. T. Hill, K. B. Platt, J. Christopher-Hennings, and E. A. Nelson. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol* 55: 231-40.

Wills, R., J.J. Zimmerman, K. Yoon, S.L. Swenson, M.J. McGinley, H.T. Hill, K.B. Platt. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Isolation from chronically infected swine. In: *Proc. 26<sup>th</sup> Annu. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp 387-389.

Yaeger, M. J., T. Prieve, J. Collins, J. Christopher Hennings, N. Nelson, and D. Benfield. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health and Production* 1: 7-9.

Yoon, I. J., H. S. Joo, W. T. Christianson, H. S. Kim, J. E. Collins, J. H. Carlson, and S. A. Dee. 1992a. Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*. 4: 139-143.

Yoon, I. J., H. S. Joo, W. T. Christianson, H. S. Kim, J. E. Collins, R. B. Morrison, and G. D. Dial. 1992b. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest*. 4: 144-147.

Yoon, I. J., H. S. Joo, W. T. Christianson, R. B. Morrison, and G. D. Dial. 1993. Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health and Production* 1: 5-8.

Yoon, K. J. W., L. L.; Zimmerman, J. J.; Hill, H. T.; Platt, K. B. 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* 9: 51-63.

Yoon, K. J., J. J. Zimmerman, S. L. Swenson, M. J. McGinley, K. A. Eernisse, A. Brevik, L. L. Rhinehart, M. L. Frey, H. T. Hill, and K. B. Platt. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7: 305-12.

Yoon, K. J., J. J. Zimmerman, S. L. Swenson, R. W. Wills, H. T. Hill, K. B. Platt, P. Poomvises, and P. Ingkaninun. 1994. Assessment of the biological significance of antibody dependent enhancement (ADE) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (REARS) virus infection in passively immunized pigs. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand*.

Yoon, K.J., L.L. Wu, J.J. Zimmermann, K.B. Platt. 1997. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody-dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet. Microbiol.*, 55: 277-87.

Yuan, S., C. J. Nelsen, M. P. Murtaugh, B. J. Schmitt, and K. S. Faaberg. 1999.

Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 61: 87-98.

Zeman, D., R. Neiger, M. Yaeger, E. Nelson, D. Benfield, P. Leslie-Steen, J. Thomson, D. Miskimins, R. Daly, and M. Minehart. 1993. Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. *J Vet Diagn Invest* 5: 522-8.

Zeman, D.H. 1996. Concurrent respiratory-infections in 221 cases of PRRS virus Pneumonia-1992-1994. *Swine Health and Production* , 4: 143-145.

Zhang, Y. S., R. D.; Paul, P. S. 1998. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 63: 125-136.

Zhou, Y. B., S.; Choi, C.; Rossow, K.; Collins, J.; Laber, J.; Molitor, T.; Murtaugh, M. 1992. Effect of SIRS v irus infection in leukocyte populations in the peripheral blood and on cytokine expression in alveolar macrophages of growing pigs. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsletter* 4: 28.

Zimmerman, J. J., K. J. Yoon, R. W. Wills, and S. L. Swenson. 1997. General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol* 55: 187-96.

Zimmerman, J., T. Sanderson, K. Eernisse, H. Hill, M. Frey. 1992. Transmission of SIRS virus from convalescent animals to mommingled penmates under experimental conditions. *Am. Assoc. Swine Practd Newsl.* , 4: 27.

Zimmermann, J.J., C.C. Chang, D. Horter, K.J. Yoon. 2000. Control of porcine reproductive and respiratory syndrome: the challenge of identifying carrier animals. *Vet. Res.*, 31: 91.